

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
⑪ 公開特許公報 (A) 昭64-6219

⑫ Int.CI.¹ 識別記号 厅内整理番号 ⑬ 公開 昭和64年(1989)1月10日
A 61 K 37/02 ACB 8615-4C

審査請求 未請求 請求項の数 21 (全 56 頁)

⑭ 発明の名称 トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチド

⑮ 特 願 昭63-2027

⑯ 出 願 昭63(1988)1月8日

優先権主張 ⑰ 昭62(1987)1月8日 ⑯ 日本 (JP) ⑮ 特願 昭62-1065

⑰ 昭62(1987)1月8日 ⑯ 日本 (JP) ⑮ 特願 昭62-1066

⑰ 昭62(1987)6月11日 ⑯ 日本 (JP) ⑮ 特願 昭62-144081

⑰ 昭62(1987)12月4日 ⑯ 日本 (JP) ⑮ 特願 昭62-305876

⑰ 昭62(1987)12月4日 ⑯ 日本 (JP) ⑮ 特願 昭62-305877

⑰ 昭62(1987)12月4日 ⑯ 日本 (JP) ⑮ 特願 昭62-305878

⑰ 発明者 山本 修 司 静岡県富士市蛟島2番地の1 旭化成工業株式会社内

⑰ 発明者 鈴木 宏治 三重県津市鳥居町191-2番地

⑯ 出願人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明細書

1. 発明の名称

トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチド

2. 特許請求の範囲

1. 次式 (I) :

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
Cys Glu Tyr Cys Cys Cys Pro Leu Asn Cys Thr
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Cys Glu Gly Phe Ala
Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Cys Met
Phe Cys Asn Cys Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
Asp Pro Asn Thr Cys Ala Ser Cys Glu Cys Pro
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
Cys Ser Cys Val Cys His Asn Leu Pro Cys Thr
Phe Cys Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys ... (I)

で表わされるアミノ酸配列を式 (I) で表わされるアミノ酸配列のN末端に結合してなる請求項

変異体。

2. 更に、次式：

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Cys
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Cys Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Cys Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Cys Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Cys His
Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Cys Arg Cys Val Asn Thr
Cys Cys Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys

で表わされるアミノ酸配列を式 (I) で表わされるアミノ酸配列のN末端に結合してなる請求項
(I) 記載のペプチド。

3. 更に、次式：

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Cys
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Cys Ala Asp Gly

Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gin Ser Cys
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
 Pro Asp Gin Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
 Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gin His
 Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
 Pro Ser Pro Cys Pro Gin Arg Cys Val Asn Thr
 Gin Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
 Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys. 及び
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
 Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
 His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされるアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合してなる請求項(1)記載のペプチド。

4. 更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gin Pro Gly Gly Ser Gin
 Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
 Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gin Ile
 Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val

- 3 -

Ser Ala Thr Gin Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
 His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gin Pro Gly
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
 Leu Ala Ala Asp Gin His Arg Cys Glu Asp Val
 Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
 Gin Arg Cys Val Asn Thr Gin Gly Gly Phe Glu
 Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
 Gly Glu Cys. 及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
 Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
 His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされるアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合してなる請求項(1)記載のペプチド。

5. 更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gin Pro Gly Gly Ser Gin
 Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
 Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gin Ile
 Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val

Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
 Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
 Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gin Leu Pro Pro Gly
 Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
 Gly Phe Gin Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
 Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
 Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Gly
 Pro Ile Trp Glu Glu Gin Gin Cys Glu Val Lys
 Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
 Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
 Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
 Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gin
 Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
 Pro Leu Gly Leu Gin Leu Met Cys Thr Ala Pro
 Pro Gly Ala Val Gin Gly His Trp Ala Arg Glu
 Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
 Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
 Gly Ala Pro Arg Cys Gin Cys Pro Ala Gly Ala
 Ala Leu Gin Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala

- 4 -

Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
 Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
 Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gin Leu Pro Pro Gly
 Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
 Gly Phe Gin Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
 Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
 Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Gly
 Pro Ile Trp Glu Glu Gin Gin Cys Glu Val Lys
 Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
 Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
 Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
 Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gin
 Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
 Pro Leu Gly Leu Gin Leu Met Cys Thr Ala Pro
 Pro Gly Ala Val Gin Gly His Trp Ala Arg Glu
 Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
 Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
 Gly Ala Pro Arg Cys Gin Cys Pro Ala Gly Ala
 Ala Leu Gin Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala

- 5 -

Ser Ala Thr Gin Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
 His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gin Pro Gly
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
 Leu Ala Ala Asp Glu His Arg Cys Glu Asp Val
 Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
 Gin Arg Cys Val Asn Thr Gin Gly Gly Phe Glu
 Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
 Gly Glu Cys、及び
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
 Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
 His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala
 Ser Leu Cys Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu
 Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gin Gly Ala Ala
 Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro
 Ser Lys Glu Val Val Leu Gin His Val Arg Thr
 Glu Arg Thr Pro Gin Arg Leu
 で表わされるアミノ酸配列を式(Ⅰ)で表わされるアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合してなる請求項(1)記載のペプチド。

- 7 -

CTGCCCTCCC AACCCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC
 ATGTGGGAGA CCGGCTACCG GCTGGGGGCC GACCAACACC
 GGTGGGAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTGC
 GTGTCCCGAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG
 TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT
 GT

で表わされる塩基配列を式(Ⅱ)で表わされる塩基配列の5'末端に結合してなる請求項(6)記載のデオキシリボ核酸。

8. 更に、次式：

TG CAGCGTGGAG AACGGGGCT CCCGACCC
 GTGCAATGCG ATCCCTGGGG CTCCCCCTG CCAGTCCCCA
 CCCGGGGCGCC CCCTGCAGGC AGACGGGGCC TCCCTGCACCG
 CATCCGGGAC GCACTCTGC AACGACCTCT CGGAGCACTT
 CTGCCCTCCC AACCCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC
 ATGTGGGAGA CCGGCTACCG GCTGGGGGCC GACCAACACC
 GGTGGGAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTGC
 GTGTCCCGAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG
 TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT
 GT、及び

GT、及び

6. 遺伝暗号の翻訳に基づき少なくとも1箇の塩基が置換されている又は置換されていない次式

(II) :

GTGGAGCC CGTGGACCCCG TGCTTCAGAG CGAACTGGCA
 GTACCCAGTGC CAGCCCCCTGA ACCAAACTAG CTACCTCTGC
 GTCTGGGGCC AGGGCTTCGC GCCCATTCCC CACGACCCGC
 ACAGGTCGCA GATGTTTTCG AACCAGACTG CCTGTCCAGC
 CGACTCCGAC CCCAACACCC AGGCTAGCTG TGAGTCCCC
 GAAGGCTACA TCTCTGGACGA CGGTTTCACTG TGCACGGAC
 TCGACCGAGTG CGAAAACGGC CGCTTCTGCT CGGGGGTGTG
 CCACAACTC CCGGGTACCT TCGACTGCAT CTGGGGGGCC
 GACTCGGGCC TTGTCCCCCA CATTGGCACC GACTGT ...

(II)

で表わされる塩基配列を含有するデオキシリボ核酸。

7. 更に、次式：

TG CAGCGTGGAG AACGGGGCT CCCGACCC
 GTGCAATGCG ATCCCTGGGG CTCCCCCTG CCAGTCCCCA
 CCCGGGGCGCC CCCTGCAGGC AGACGGGGCC TCCCTGCACCG
 CATCCGGGAC GCACTCTGC AACGACCTCT CGGAGCACTT

- 8 -

GACT CGGGCAAGGT GGACGGTGGC GACACGGCT
 CTGGCCAGCC CCCGCCAGC CCGACGCCCG GCTCCACCTT
 GACTCCTCCG CCCGTGGGGC TCGTGCATTC GGGC

で表わされる塩基配列を式(II)で表わされる塩基配列の5'末端と3'末端にそれぞれ結合してなる請求項(6)記載のデオキシリボ核酸。

8. 更に、次式：

GCACCCGAG AGCCGCAGCC GGGTGGCAGC CAGTGGTGC
 AGCACCACTG CTTCGGGGCTC TACCCGGGCC CGGGACCTT
 CCTCAATGCC ACTCACATCT GCGACGGACT GCGGGGCCAC
 CTAATGACAG TCCGCTCTC GCTGGCTGCC GATGTCATT
 CCTTGCTACT GAAACGGGAC GGGGGCGTGC GCGGGGGGG
 CCTCTGGATC GCGCTGCAGC TGGCACCCGG CTGGGGGCCAC
 CCCAAGGGCC TCGGGGGCCCT GGGGGGCTTC CAGTGGTTA
 CGGGAGACAA CAACACCGAC TATACCGAGT GGGCACGGCT
 CGACCTCAAT GGGGCTCCCG TCTGGGGCCC TTGTCGGCTC
 GCTGTCTCCG CTGCTGGAGG CACTGTGCC AGGGAGCCGA
 TCTGGGAGGA CGACCACTGCA GAACTGAAGG CGGATGGCTT
 CCTCTGGAG TTCCACTTCC CAGCCACCTG CACGGCACTG
 GCTGTGGAGC CGGGGGGGCC GCGTGGCATCA

- 10 -

CCTTACGGCAC CCCGTTCCCG GCCCCGGGAG CGGACTTCCA
 GGGCCTCCCG GTGGGGCAGCT CGCCGGGGT GGCTCCCTC
 GGCTTACAGC TAATGTGCAC CGCCGGGGCC GGAGGGTCC
 AGGGGCACTG CGCCAGGGAG CGCCGGGGCG CTGGGACTG
 CAGCGTGGAG AACGGGGCT CGGAGCACCC GTGCAATGCC
 ATCCCTGGG CTCCCCGCTG CGAGTGGCCA GCGGGGGCC
 CCTGGAGGC AGACGGGGCG TCCTGCACCG CATCCGGAC
 CGACTCCGTC AACGACCTCT CGGAGCACTT CTGGTTC
 AACCCGACC ACCCGGGCTC CTACTCGTGC ATGTGGAGA
 CGGGCTACCG GCTGGGGCC GACCAACACC GGTGGGAGGA
 CGTGGATGAC TGCATACTGG ACCCCAGTCC GTGCCCCAG
 CGCTGTGCA ACACACAGGG TGGCTTCAG TGCCACTGCT
 ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGACT GT、及び
 GACT CGGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGGGCT
 CTGGGGAGCC CCCGGCCAGC CGGACGGGGCG GCTCCACCTT
 GACTCCCTCCG GCGCTGGGGC TCGTGCATTC GGGC
 で表わされる塩基配列を式(II)で表わされる塩基
 配列の5'末端と3'末端にそれぞれ結合してな
 る請求項(6)記載のデオキシリボ核酸。

10. 更に、次式：

- 11 -

CGACTCTGC AACGACCTCT CGGAGCACTT CTGGTTTCCC
 AACCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC ATGTGGAGA
 CGGGCTACCG GCTGGGGCC GACCAACACC GGTGGGAGGA
 CGTGGATGAC TGCATACTGG ACCCCAGTCC GTGCCCCAG
 CGCTGTGCA ACACACAGGG TGGCTTCAG TGCCACTGCT
 ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGACT GT、及び
 GACT CGGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGGGCT
 CTGGGGAGCC CCCGGCCAGC CGGACGGGGCG GCTCCACCTT
 GACTCCCTCCG GCGCTGGGGC TCGTGCATTC GGCTTGTC
 ATAGGCATCT CCATCGGAG CCTGTCCTG TGCGTGGCGC
 TTTTGGGCT CCTCTGCCAC CTGCCAAGA AGCAGGGCGC
 CGGCAAGGGCC AACATGGAGT ACAAGTGGCC GGGCCCTTCC
 AAGGGGTAG TGCTGCAGCA CGTGGGGACC GAGGGGACGC
 CGCAGACACT C
 で表わされる塩基配列を式(II)で表わされる塩基
 配列の5'末端と3'末端にそれぞれ結合してな
 る請求項(6)記載のデオキシリボ核酸。

11. 請求項(6)乃至(10)記載のいずれかのデオキシリボ核酸と相補的なデオキシリボ核酸。

GCACCCGGAG AGCCGGCAGCC CGGTGGCAGC CAGTGGCTCG
 ACCACCACTG CTTCGGGCTC TACCCGGGCC CGGGACCTT
 CCTCAATGCC AGTCAGATCT CGGACGGACT CGGGGGCCAC
 CTAATCACAG TGGCTCCCTC CGTGGCTGCC GATGTGATT
 CCTTGCTACT GAACGGGGAC CGCCGGCGTTG GCGGGGGCG
 CCTCTGGATC GCGCTGCAGC TGCCACCCGG CTGGGGGAC
 CCCAAGGGCC TCGGGCCCT CGCGGGCTTC CAGTGGTTA
 CGGGAGACAA CAACACCAAGC TATACGAGT GGGCACGGCT
 CGACCTCAAT GGGCTCCCTC TCTGGGGCC GTGTCGTC
 CCTGCTCCG CTGCTGAGGC CACTGTGCC ACCGACCCGA
 TCTGGGAGGA CGAGCACTGC GAAGTGAAGG CGCATGGCTT
 CCTCTGGAG TTGCACTTCC CAGCCACCTG CAGGGCACTG
 GCTGTGGAGC CGGGGGGGCG GGTGGGGCC CTCTGGATCA
 CCTACGGCAC CCCGTTGGC GCGGGGGAG CGGACTTCCA
 GGGCTGGCG GTGGGAGCT CGCCGGCGGT CGCTCCCTC
 GGCTTACAGC TAATGTGCAC CGCCGGGGCC CGAGGGTCC
 AGGGGCACTG CGCCAGGGAG CGCCGGGGCG CTGGGACTG
 CAGCGTGGAG AACGGGGCT CGGAGCACCC GTGCAATGCC
 ATCCCTGGG CTCCCCGCTG CGACTGGCCA GCGGGGGCC
 CCTGGAGGC AGACGGGGCG TCCTGCACCG CATCCGGAC

- 12 -

12. 請求項(6)乃至(10)記載のデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換えDNA。

13. 請求項(11)記載のデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換えDNA。

14. 請求項(12)記載の複製可能な組換えDNAで形質転換された微生物または細胞。

15. 請求項(13)記載の複製可能な組換えDNAで形質転換された微生物または細胞。

16. 次式(1)：

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
 Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
 Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met
 Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
 Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
 Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
 Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
 Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr

Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys ... (I)

で表わされるアミノ酸配列を含有することを特徴とする、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドまたはその相同変異体の製造方法にして、

(a) 該ペプチドをコードする塩基配列を含有するデオキシリボ核酸を複製可能な発現ベクターに結合して該デオキシリボ核酸と該複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換え体DNAを得、

(b) 該複製可能な組換え体DNAで微生物又は細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、

(c) 該形質転換体を該微生物または細胞の親細胞から選別し、

(d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該デオキシリボ核酸を発現させて、該ペプチドを産生せしめ、そして

(e) 該ペプチドを培養した形質転換体から単離することを含むペプチドの製造方法。

- 15 -

17. 該ペプチドが、更に、次式：

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Gln Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys

で表わされるアミノ酸配列を式(I)で表わされるアミノ酸配列のN末端に結合してなる請求項

(17) 記載の医薬組成物。

18. 該ペプチドが更に、次式：

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys

- 17 -

17. 有効な量の次式(1)：

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met
Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr
Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys ... (I)

で表わされるアミノ酸配列を含有することを特徴とする、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドまたはその相同変異体；及び

少なくとも1種の薬剤として投与可能な担体、希釈液または賦形剤を含有する医薬組成物。

- 16 -

Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Gln Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys, 及び
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(I)で表わされるアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合してなる請求項(17)記載の医薬組成物。

20. 該ペプチドが更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu

- 143 -

- 18 -

Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
 Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gin Leu Pro Pro Gly
 Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
 Gly Phe Gin Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
 Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
 Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
 Pro Ile Trp Glu Glu Gin Cys Glu Val Lys
 Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
 Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
 Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
 Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gin
 Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
 Pro Leu Gly Leu Gin Leu Met Cys Thr Ala Pro
 Pro Gly Ala Val Gin Gly His Trp Ala Arg Glu
 Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
 Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
 Gly Ala Pro Arg Cys Gin Cys Pro Ala Gly Ala
 Ala Leu Gin Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
 Ser Ala Thr Gin Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu

- 18 -

Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
 Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gin Leu Pro Pro Gly
 Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
 Gly Phe Gin Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
 Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
 Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
 Pro Ile Trp Glu Glu Gin Cys Glu Val Lys
 Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
 Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
 Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
 Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gin
 Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
 Pro Leu Gly Leu Gin Leu Met Cys Thr Ala Pro
 Pro Gly Ala Val Gin Gly His Trp Ala Arg Glu
 Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
 Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
 Gly Ala Pro Arg Cys Gin Cys Pro Ala Gly Ala
 Ala Leu Gin Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
 Ser Ala Thr Gin Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu

- 21 -

His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gin Pro Gly
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
 Leu Ala Ala Asp Gin His Arg Cys Glu Asp Val
 Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
 Gin Arg Cys Val Asn Thr Gin Gly Gly Phe Glu
 Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
 Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
 Ser Gly Glu Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
 His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされるアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合してなる請求項(17)記載の医薬組成物。

21. 敗ペプチドが更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gin Pro Gly Gly Ser Gin
 Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
 Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gin Ile
 Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
 Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu

- 20 -

His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gin Pro Gly
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
 Leu Ala Ala Asp Gin His Arg Cys Glu Asp Val
 Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
 Gin Arg Cys Val Asn Thr Gin Gly Gly Phe Glu
 Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
 Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
 Ser Gly Glu Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
 His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala
 Ser Leu Cys Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu
 Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gin Gly Ala Ala
 Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro
 Ser Lys Glu Val Val Leu Gin His Val Arg Thr
 Glu Arg Thr Pro Gin Arg Leu

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされるアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合してなる請求項(17)記載の医薬組成物。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はトロンビンのプロテインC活性化を促進する作用を有する新規なペプチドに関する。更に詳しく述べては、本発明は血栓溶解作用、抗血栓凝固作用及び血小板凝集抑制作用を有し、循環器系の疾患の治療に有用なペプチドに関する。本発明は、また、その新規なペプチドをコードするデオキシリボ核酸（以下“DNA”と称する）、該DNAを含有する複製可能な組換え体DNA、該組換えDNAで形質転換された微生物または細胞及び組換えDNA技術による該ペプチドの製造方法に関する。

本明細書において、アミノ酸及びペプチドは下記に示すIUPAC-IUB生物化学命名委員会(CBN)で採用された略号を用いて表される。なお、アミノ酸などに關し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければし体を示すものとする。更に、特に明示しない限りペプチドのアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれN末端およびC

- 23 -

Cys: システイン残基

また、ポリデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは下記の如き略号で表されるデオキシリボヌクレオチドの配列により表記する。

A: 2' - デオキシアデニル酸残基

C: 2' - デオキシシチジル酸残基

G: 2' - デオキシグアニル酸残基

T: チミジル酸残基

特にことわらない限り、デオキシリボヌクレオチド配列の左端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

(従来の技術)

現在、血栓溶解剤として用いられているものには、ストレプトキナーゼやウロキナーゼがある。また、抗血栓凝固剤としてはヘパリンやワーファリンが用いられている。さらに、血小板凝集抑制剤としてはアスピリン、スルフィンピラゾン、ジビリダモール等が使われている。

現在これらの血栓溶解剤、抗血栓凝固剤および血小板凝集抑制剤は、それぞれ別個に、あるいは

末端である。

Gln: グルタミン残基

Asp: アスパラギン酸残基

Pro: プロリン残基

Tyr: チロシン残基

Val: バリン残基

Lys: リジン残基

Glu: グルタミン酸残基

Ala: アラニン残基

Asn: アスパラギン残基

Leu: ロイシン残基

Phe: フェニルアラニン残基

Gly: グリシン残基

His: ヒスチジン残基

Ser: セリン残基

Thr: スレオニン残基

Ile: イソロイシン残基

Trp: トリプトファン残基

Arg: アルギニン残基

Met: メチオニン残基

- 24 -

併用して、例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療及び予防に用いられている。しかしながら、これらの血栓溶解剤、抗血栓凝固剤および血小板凝集抑制剤は非常に複雑な機構から成り立つ血液の凝固線維系の極く一部に作用するにすぎない。そこで、血液の凝固線維系に広く作用し、優れた血栓凝固抑制作用を示す薬剤が求められていた。

ところで、血液凝固機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質としてプロテインCが知られている。近年、そのプロテインCの活性化を促進し、トロンビンの作用による血小板の活性化とフィブリリン形成を抑制する物質が、ウサギの肺、ウシの肺、ヒトの肺やヒト胎盤などに存在し、それが前述の薬剤に比べて優れた血液凝固抑制作用を有することが報告されている。ウサギ肺に存在する質について、例えば、シーティー・エスモン(C.T. Eason)ら、プロシーデ

- 25 -

-145-

- 26 -

イング、オブ、ナショナル、アカデミー、オブ、サイエンス、ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、78巻、2249頁 (1981年) ; エヌ.エル.エスモン (N. L. Esmon) ら、ザ、ジャーナル、オブ、バイオロジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、257巻、859頁 (1982年) ; シー.ティー.エスモン (C. T. Esmon) ら、ザ、ジャーナル、オブ、バイオロジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、257巻、7944頁 (1982年) ; エヌ.エル.エスモン (N. L. Esmon) ら、ザ、ジャーナル、オブ、バイオロジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、258巻、12238頁 (1982年) を参照することができる。ウシの肺に存在する物質については、例えば楠本ら、生化学、56巻、890頁 (1984年) を参照することができる。また、ヒト胎盤に存在する物質については、例えば特開昭60-109819; 黒沢ら、日本血液学会誌、47巻、632頁 (1984年) ; エッチ、エッチ、サー

- 27 -

性化して血液凝固を抑制するだけでなく、線溶作用を増進する物質を見出すべく篠原研究を重ねた結果、意外にも、後述するように特定のアミノ酸配列を有するペプチドが、トロンビンによるプロテインC活性化を促進して血液凝固を制御することができるだけでなく、線溶を促進することができ、血液凝固を制御する薬剤として有用であることを見出した。更にまた、そのペプチドが、組換えDNA技術によって大量にかつ容易に製造できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成した。

即ち、本発明の目的は、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する新規なペプチドを提供することにある。

また、本発明の別の目的は、上記ペプチペドをコードするDNAを提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、該ペプチペドをコードするDNAを含有する複製可能な組換えDNAを提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、上述のような

レム、(H. H. Saleem) ら、ジャーナル、オブ、バイオロジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、259巻、12246頁 (1984年) ; エス、クロサワ (S. Kurokawa) ら、トロンボシス、リサーチ (Thrombosis Research)、37巻、353頁 (1985年) を参照することができる。また、ヒト肺に存在する物質については、例えば楠本ら、生化学、57巻、1102頁 (1985年) を参照することができる。

上記の先行技術文献には上記物質の一般的性質が記載されている。しかしながら、その物質の構造、例えばアミノ酸配列などは解明されておらず、未だにその物質は同定されていない。従って、上記の先行技術文献に報告されている物質が单一物質であるか否か、また、これらの先行技術文献の記載にしたがって同一の物質が繰返し得られるか否かについては全く不明である。

(発明が解決しようとする問題)

本発明者等は、上述の技術的背景にあって、血液の凝固線溶系の一因子であるプロテインCを活

- 28 -

組換え体DNAを形質転換された微生物または細胞を提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、上述のようなペプチドの製造方法を提供することにある。

(問題を解決する為の手段および作用)

即ち、本質的には本発明によれば、次式 (I) :

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met
Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
Glu Cys Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr
Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys . . . (I)
で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とする、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドまたはその相同変

具体が提供される。

本発明のペプチドは前記式(1)で表されるアミノ酸配列を含有する。本発明のペプチドは実質的に前記式(1)で表されるアミノ酸配列から成っていてもよいし、また、式(1)で表されるアミノ酸配列と、そのN末端及び/またはC末端に結合した少なくとも1種の他のペプチドのアミノ酸配列を更に含有してもよい。式(1)で表されるアミノ酸配列と、少なくとも1種の他のペプチドのアミノ酸配列を含有するペプチドの例としては下記のペプチドの(1)~(4)が挙げられる。

(1) 式(1)で表されるアミノ酸配列とそのN末端に結合した下記のアミノ酸配列:

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His

- 31 -

Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

を含有するペプチド。

(3) 式(1)で表されるアミノ酸配列とそのN末端及びC末端にそれぞれ結合した下記のアミノ酸配列:

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
Pro Ile Trp Glu Glu Gln Cys Glu Val Lys

- 33 -

Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys
を含有するペプチド。

(2) 式(1)で表されるアミノ酸配列とそのN末端及びC末端にそれぞれ結合した下記のアミノ酸配列:

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys、及び
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly

- 32 -

Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Gln Pro Gly
Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
Gly Glu Cys、及び
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly

- 34 -

Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

を含有するペプチド。

(4) 式 (1) で表されるアミノ酸配列とそのN末端及びC末端にそれぞれ結合した下記のアミノ酸配列:

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Clu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
Pro Ile Trp Glu Glu Gln Cys Glu Val Lys

- 35 -

Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala
Ser Leu Cys Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu
Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly Ala Ala
Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro
Ser Lys Glu Val Val Leu Gln His Val Arg Thr
Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu

を含有するペプチド。

本発明のブチペドはN末端アミノ酸残基としてアミノ酸メチオニンを含有していてもよい。

本発明のブチペドはまた、N末端アミノ酸配列として、例えば次式:

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala
Leu Ala Gly Leu Gly Phe Pro

で表されるアミノ酸配列を有するリーダー配列を含有していてもよい。自然の変異によりまたは人工の変異により、ペプチドの活性に重大な変化を与えることなく、ペプチドの 造の一部を変化させることが可能である。本発明のペプチドは、前

Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
Gly Glu Cys、及び
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly

- 36 -

記アミノ酸配列を有するペプチドの相同體異体 (Homologous variant) に相当する構造を有するペプチドも包含する。本発明のペプチドは少なくとも1個の側残基を含有していてもよいし、含有していないなくてもよい。

本発明のもう一つの態様によれば、遺伝暗号の縮置に基づき少なくとも1個の塩基が置換されているまたは置換されていない次式 (II) :

GTGGAGCC CGTGGACCCC TCCTTCAGAG CCAACTGGCA
GTACCACTGC CAGCCCCCTGA ACCAAACTAG CTACCTCTGC
CTCTGGCCCG AGGGCTTCGG GCCCCATTCGG CACCGAGCCG
ACACGTGCCA GATGTTTTGC AACCAACACTG CCTCTCCAGC
CGACTGGCAC CCCAACACCC AGGCTACCTG TGAGTGGCCT
GAACGCTACA TCCTGGACCA CGGTTTCATC TCCACCGACA
TCCACGGACTG CGAAAACGGC CGCTTCTGCT CGGGGGTGTG
CCACAAACCTC CCCCCGTACCT TCGAGTGCAT CTGGGGGGCC
GACTCGGGCCC TTGTCGGCCA CATTGGCCACC GACTCT ...

(II) で表される塩基配列を含有するデオキシリボ核酸が供給される。

本発明のデオキシリボ核酸 (DNA) は前記式

(II) で表される塩基配列を含有するものである。式 (II) で表される塩基配列は前記式 (I) で表されるアミノ酸配列をコードするものである。本発明のDNAは前記式 (II) で表される塩基配列と、その5'末端および/または3'末端に結合した少なくとも1種の他の塩基配列とを含有していてもよい。式 (II) で表される塩基配列と少なくとも1種の他の塩基配列とを含有するDNAの例としては下記のDNA (1) ~ (4) が挙げられる。

(1) 式 (II) で表される塩基配列とその5'末端に結合した式：

TG CAGCGTGGAG AACGGGGGCT CGGAGGCACGC
CTGCAATGGG ATCCCTGGG CTCCCCGCTG CCAGTCCCCA
CCCGGGGGGG CCCTGCCAGGC AGACGGGGCGC TCCCTGCACCG
CATCCCGGAC GCACTCCCTGC AACGACCTCT CGCAGGACTT
CTGGCTTCCC AACCCCCGACC AGCCCCGCTC CTACTCGTGC
ATGTGCCAGA CGGGCTACCG CCTGGGGGCC GACCAACACC
GGTGGCAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCAGTCC
GTGTCCCGAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCCAG

- 39 -

末端および3'末端にそれぞれ結合した式：

GCACCCCCAG AGCCGGAGCC CGGTGGCAGC CAGTGGCTCG
AGCCAGCACTG CTGGGGCTC TACCCCCGGG CGGGCACCTT
CCTCAATGCC AGTCAGATCT CGGACGGACT GCGGGGGCGC
CTAATGACAG TGGCCTCCCTC GGTGGCTGCC GATGTCATT
CCTTGCTACT GAACGGCGAC CGGGGGGTG GCGGGGGCG
CCTCTGGATC CGGCTGGAGC TGGCCACCCCG CTGGGGCGAC
CCCAAGGCC CGGGGGCCCT CGGGGGCTTC CAGTGGCTTA
CGGGAGACAA CAACACCAAGC TATAGCAGGT GGGCACGGCT
CGACCTCAAT CGGGCTCCCC TCTCCCCGGG CTGGCTGCC
GCTGTCTCCG CTGGCTGAGGC CACTGTCCCC AGCGAGCCGA
TCTGGGGAGGA CGACCGAGTGC GAAGTGAAGG CGGATGGCTT
CTCTGGAGG TTCCACTTCC CAGCCACCTG CAGGGCACTG
GCTGTGGAGC CGGGGGGGCG CGCTGGGGCC GTCTGGATCA
CCTACGGCAC CGGGCTGGCG GCGGGGGAG CGGACTTCCA
GGGGCTGGCG GTGGGGAGCT CGGGGGGGGT CGCTCCCCCTC
CGCTTACACC TAATGTGCAC CGGGGGGGGG CGAGGGCTCC
AGGGGCACTG GGCCAGGGAG GCGGGGGGGCG CTGGGACTG
CAGCGTGGAG AACGGGGGCT CGGAGGCACGC GTGCAATGGG
ATCCCTGGG CTCCCCGCTG CGAGTGGCCA CGGGGGGGCG

TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGGGAGT

GT

で表される塩基配列とを含有するDNA。

(2) 式 (II) で表される塩基配列とその5'末端および3'末端にそれぞれ結合した式：

TO CAGCGTGGAG AACGGGGGCT CGCAGGACCG
CTGCAATGGG ATCCCTGGG CTCCCCGCTG CCAGTGCACCG
CCCGGGGGGG CGCTGCCAGGC AGACGGGGCGC TCCCTGCACCG
CATCCCGGAC GCACTCCCTGC AACGACCTCT CGCAGGACTT
CTGGCTTCCC AACCCCCGACC AGCCCCGCTC CTACTCGTGC
ATGTGCCAGA CGGGCTACCG CCTGGGGGCC GACCAACACC
GGTGGCAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCAGTCC
GTGTCCCGAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCCAG
TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGGGAGT
GT、及び

GACT CGGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGGGCT
CTGGGGAGCC CGGGGGCCAGC CGGACGGGGCG CGTCCACCTT
GACTCGTCCC CGGGCTGGGGC TCGTGCATTC GGGC

で表される塩基配列とを含有するDNA。

(3) 式 (II) で表される塩基配列とその5'末端に結合した式：

CGCTGCCAGGC AGACGGGGCGC TCCCTGCACCG CATCCCGGAC
GCACTCCCTGC AACGACCTCT CGCAGGACTT CTGGCTTCCC
AACCCCCGACC AGCCCCGCTC CTACTCGTGC ATGTGCCAGA
CGGGCTACCG CCTGGGGGCC GACCAACACC GGTGGCAGGA
CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCAGTCC GTGTCCCGAG
CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCCAG TGCCACTGCT
ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGGGAGT GT、及び

GACT CGGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGGGCT
CTGGGGAGCC CGGGGGCCAGC CGGACGGGGCG CGTCCACCTT
GACTCGTCCC CGGGCTGGGGC TCGTCCATTC GGGC

で表される塩基配列とを含有するDNA。

(以下余白)

(4) 式 (I) で表される塩基配列とその 5' 実端および 3' 実端にそれぞれ結合した次式:

GCACCCCGAG AGCGGCAGCC GGGTGGCAGC CAGTGGCTCG
AGCACGACTG CTTCCGGCTC TACCCGGGCC CGGGGACCTT
CCTCAATGCC AGTCAGATCT GCGACGGACT GCGGGGCCAC
CTAATGACAG TCCGCTCTC GGTGGCTGCC GATGTCATT
CCTTGCTACT GAACGGCGAC GCGCCGCTTC GCGGGGGGGC
CCTCTGGATC GGCCTGCAGC TGCCACCCGG CTGGGGCGAC
CCCAACCCCG TCGGGCCCTC GCGCCGCTTC CACTGGGTTA
CGGGAGACAA CAACACCAGC TATACCGAGGT GGGCACGGCT
CGACCTCAAT GGGGCTCCCC TCTGGGGGCC GTTGTGGCTC
GCTGCTCTCGG CTGCTGAGGC CACTGTGCC AGCGAGCCGA
TCTGGGAGGA CGAGCAGTGC GAAGTGAAGG CGGATGGCTT
CCTCTGGAGG TTCCACTTCC CAGCCACCTC CAGGGCACTG
GCTGTCGAGC CGGGGGCCCG GGCCTGCCGCC GTCTCGATCA
CCTACGGCAC CCCGTTGGG GCGGGGGGAG CGGACTTCCA
GGCGCTGGCG CGGGGAGCT CGGGCGCGGT GGCCTCCCC
GGCTTACAGC TAATGTCAC CGGGCCGCC GGAAGGGTCC
AGGGGCACTG GGCGAGGGAG GCGGGGGGGC CTGGGACTG
CAGCGTGGAG AACGGGGGCT GCGAGCACCC GTGCAATCCG

- 43 -

ことができる。

[1] トロンビンのプロテインC活性化を促進することができるヒト肺由来のペプチドに特異的な、ウサギから得られる抗体を用いて、ヒト肺から調製した cDNA ライブラリーからその抗体と結合するペプチドをコードする cDNA 断片を単離し、単離した cDNA 断片の塩基配列を分析する。得られた cDNA 断片はトロンビンのプロテインC活性化を促進することができるヒト肺由来のペプチドの一部をコードしている。その部分はそのペプチドの C 実端を含むが N 実端を含まない。

[2] 上述のように、得られた cDNA 断片はヒト肺由来のペプチドの全アミノ酸配列をコードしておらず、そのペプチドの N 実端アミノ酸配列に対応する塩基配列を欠いているので、N 実端アミノ酸配列をコードする cDNA 断片を上記工程 (1) で得られる cDNA 断片を利用して通常の公知のプライマーエクステンション法により以下のようにして得る。まず、上記工程 (1) で得られた cDNA 断片のコードするペプチドの N 実端

ATCCCTGGGG CTCCCCGCTG CCAGTCCCCA GCCGGCGCGG
CCCTCCAGGC AGACGGGGCGC TCCTGCACCG CATCGCGAC
CCAGTCTGTC AACGACCTCT GCGAGGACTT CTGGGTTCCC
AACCCCGACG AGCGGGGCTC CTACTCGTGC ATGTGGGAGA
CGGGGTACCC GCTGGGGCCC GACCAACACC GGTGGGAGGA
CGTGGATGAC TGCTACTGG AGCCCACTGCC GTGTCGGCAG
CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCAG GGCCTACTGCT
ACCCCTAAGTA CGACCTGGTG GACGGGGACT GT、及び
GACT CGGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGGGCT
CTGGGAGCC CGGGGGGAGC CGGAGGGCCCG GCTCCACCTT
GACTCCTCCG CGCGTGGGGC TCGTGCATTC GGGCTTGCTC
ATAGCCATCT CGATGGGAGC CCTGTCCTG GTGGTGGGCC
TTTGGCGCT CCTCTGCCAC CTGGGCAAGA AGGAGGGCC
CGGGAGGGCC AGATGGAGT ACAGTGGCGC GGGCCCTTCC
AAGGAGGTAG TGCTGCAGCA CGTGGGGACC GAGGGACGC
GGCAGAGACT C

で表される塩基配列とを含有する DNA。

上記の本発明の DNA は前述のペプチドを組換え DNA 技術を用いて製造するのに用いることができる。本発明の DNA は以下のようにして得る

- 44 -

側のアミノ酸配列に対応する cDNA 断片の一部分を有機化合成する。次に、合成した DNA をプライマーとして用いて通常の公知のプライマー エクステンション法によりヒトさい帯内皮細胞より調製したポリ (A) RNA から上記工程 (1) で得られる cDNA 断片の 5' 実端の上流の塩基配列を有する cDNA 断片を得る。上記のプライマー エクステンションを繰り返すことによりヒト肺由来のペプチドの N 実端アミノ酸配列をコードする cDNA 断片を得る。

[3] 次に、前記工程 (1) 及び (2) で得られた cDNA 断片を所望のペプチドの全アミノ酸配列をコードするように結合することにより、N 実端アミノ酸のコドンから始まる 1671 塩基対 (以下 "bp" と略する) のオープンリーディングフレームを含有する cDNA (以下 "cDNA-A" と略する) を得る。このオープンリーディングフレームの塩基配列は前述の DNA (4) の塩基配列と同じである。この cDNA-A から式 (II) で表される塩基配列及び前述の DNA (1)

～(3)の塩基配列とそれぞれ同じ塩基配列を有するcDNAを以下のようにして調製することができる。

(1) DNA (3)の塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、cDNA-Aからその5'末端から数えて1495番目の塩基から下流の部分を位置特異的変異法で削除することによって得られる。得られたcDNAは5'末端にN末端アミノ酸のコドンを含む1494bpのDNAである。

(2) DNA (2)の塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、上流(1)と同様にして得られる1494bpのcDNAからN末端アミノ酸配列に対応する678bpの部分を位置特異的変異法で削除することによって得られる。得られたcDNAは816bpである。

(3) DNA (1)の塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、以下のようにして得られる。まず初めにcDNA-Aからその5'末端から数えて1387番目の塩基から下流の部分を位

- 47 -

上記の本発明のDNAは有機化学合成することによっても得ることができる。また、本発明のDNAは前述のプライマーエクステンションを行うことなく、前駆体DNAから調製することもできる。前駆体DNAは、前記工程【1】で得られるDNA断片またはそのDNA断片の塩基配列に基づいて調製した合成DNAをプローブとして用いる通常のハイブリダイゼーション法によってヒト染色体DNAライブラリーから得ることができる。

上述の式(II)の塩基配列を含有する本発明のDNAは更に、例えば次式：

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala
Leu Ala Gly Leu Gly Phe Pro

で表されるようなりーダー配列をコードする塩基配列を5'末端塩基配列として含有していてよい。

本発明によれば、上記DNAと相補的なDNAもまた提供される。本発明によれば、上記DNAとそれに相補的なDNAが互いに相補的に結合して2重鎖DNAを形成していてよい。

- 48 -

置換的変異法で削除して5'末端にN末端アミノ酸のコドンを含む1386bpのcDNAを得る。次に得られた1386bpのcDNAから、N末端アミノ酸配列に対応する678bpの部分を位置特異的変異法で削除する。このようにして、DNA(1)の塩基配列と同じ塩基配列を有する708bpのcDNAを得る。

(IV)式(II)で表される塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、以下のようにして得られる。まず初めに、上記(III)に記載されているのと同様の方法で1386bpのcDNAを得る。次に得られた1386bpのcDNAから、N末端アミノ酸配列に対応する1032bpからなる部分を位置特異的変異法で削除する。このようにして、式(II)の塩基配列と同じ塩基配列を有する354bpのcDNAを得る。

このようにして得られた各cDNAの塩基配列は公知の方法で分析して、DNA(1)～(4)の塩基配列及び式(II)で表される塩基配列とそれぞれ一致することを確認する。

- 48 -

自然の変異によりまたは人工的変異により、主たる活性に変化を与えることなく、DNAの構造及びそれから演繹されるペプチドの構造の一部を変異せしめることが可能である。従って本発明のDNAは前述のすべてのペプチドの相同変異体に相当する構造を有するペプチドをコードする塩基配列を含有することも可能である。

遺伝暗号の縮合に従い、遺伝子から生産されるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子の塩基配列の少なくとも1つの塩基を他の類似の塩基に置換することができる。従って、本発明のDNAはまた、遺伝暗号の縮合に基づく置換によって変化された塩基配列を含有することも可能である。この場合、上記置換により得られた塩基配列から演繹されるアミノ酸配列は前に定義したアミノ酸配列と一致する。

更にまた、本発明によれば、前記の本発明のデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターとからなる複製可能な組換え体DNAが提供される。該組換え体DNAは、それによって形質転換された

微生物または細胞中で、本発明のペプチドを発現することができる。適したベクターの例としては、プラスミドpBR322、pBR327、YRp7、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pBPV-1 (9-1) (ATCC 37111)などが挙げられる。尚、発現ベクターは宿主として使用する微生物または細胞に適したものを選択する必要がある。

更に本発明はまた、上述の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞に関する。微生物の例としては、エシエリヒアコリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えばイー.コリ (*E. coli*) K12株284 (ATCC 31446)、イー.コリ (*E. coli*) B、イー.コリ (*E. coli*) X1776 (ATCC 31537)、イー.コリ (*E. coli*) C600およびイー.コリ (*E. coli*) C600hfr並びにイー.コリ (*E. coli*) W3110 (F⁻, λ⁻, プロトトロフィック、ATCC 27375)；バチラスサブチリス (*Bacillus subtilis*) の如きバチラ

- 51 -

(d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該デオキシリボ核酸を発現させて該ペプチドを産生せしめ、そして

(e) 該ペプチドを培養した形質転換体から単離することを含む本発明のペプチドの製造方法が提供される。

本発明の方法によれば、前述の本発明のDNAが正しく転写し、それによって得られるmRNAからの翻訳が正しく行われるように本発明のDNAを複製可能な発現ベクターのプロモーターなどのDNA領域の下流に組入れて該DNAを有する複製可能な組換え体DNAを得、得られた該組換え体DNAで微生物または細胞を形質転換させて該組換え体DNAを含有する形質転換体を得る。得られた形質転換体は、該組換え体DNAに与えられた表現型によって微生物または培養細胞の親細胞から単離される。得られた形質転換体を培養して前記デオキシリボ核酸の有する遺伝情報を発現させて本発明のペプチドを製造する。

- 53 -

ス (*Bacillus*) 属の菌株；サルモネラ、チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) またはセラチアマーセサンス (*Serratia marcescens*) 等の大腸菌以外の腸内菌；シュードモーナス (*Pseudomonas*) 属の種々の菌株；およびサッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などが挙げられる。細胞の例としては、VERO (ATCC CCL-81) 細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞株、WI38、BHK、COS-7およびMDCK細胞株等の動物細胞が挙げられる。

更に本発明の他の部様によれば、

(a) 前述のペプチドをコードするデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターに連結して該デオキシリボ核酸と該複製可能な発現ベクターとからなる複製可能な組換え体DNAを得、

(b) 該複製可能な組換え体DNAで微生物または細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、

(c) 該形質転換体を該微生物または細胞の親細胞から選別し、

- 52 -

尚、本発明のDNA及び組換え体DNAを構築するために必要なDNA配列、例えばプロモーターや複製起點等をクローニングするためには原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系を使用するのが好ましい。原核細胞の例としてはエシエリヒアコリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えばイー.コリ (*E. coli*) K12株284 (ATCC 31446)、イー.コリ (*E. coli*) B、イー.コリ (*E. coli*) X1776 (ATCC 31537)、イー.コリ (*E. coli*) C600およびイー.コリ (*E. coli*) C600hfr並びにイー.コリ (*E. coli*) W3110 (F⁻, λ⁻, プロトトロフィック、ATCC 27375)；バチラスサブチリス (*Bacillus subtilis*) の如きバチラス (*Bacillus*) 属の菌株；サルモネラチフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) またはセラチアマーセサンス (*Serratia marcescens*) 等の大腸菌以外の腸内細菌；シュードモーナス (*Pseudomonas*) 属の種々の菌株；およびサッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)

などが挙げられる。これらの細菌のうちエシエリヒア コリ (*E. coli*) K 12 株 294 が最も好ましい。上記微生物を宿主として使用する場合、これら微生物に適したプラスミドベクターが組換え体 DNA の複製可能な発現ベクターとして一般に用いられる。例えば大腸菌を形質転換するためのプラスミドベクターとしてはプラスミド pBR 322 や pBR 327などを用いることができる。プラスミドベクターは通常複製起點、プロモーター、および組換え体 DNA で形質転換した細胞を選別するのに有用な表現型を組換え体 DNA に与えるマーカー遺伝子等を含んでいる。プロモーターの例としては、β-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター、トリプトファンプロモーター等が挙げられる。マーカー遺伝子の例としては、アンビシリン耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子が挙げられる。一方、本発明の DNA を発現して本発明のペプチドを製造するためには上記の原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系および脊椎動物の細胞などの真核生物の細胞を宿

- 55 -

存在するプロモーターも、上述の宿主-ベクター系で使用するのに適しているならば使用することができる。

複製起源については、外来性の起源、例えば、アデノウィルス、ポリオーマ、SV40、水疱性口内炎ウィルス (VSV)、ウシ乳頭腫ウィルス (BPV) 等のウィルス由来の複製起源を用いることができる。また、発現ベクターとして宿主染色体に組み込まれるような性質を有するベクターを用いる場合、宿主染色体の複製起源を利用することができる。

本発明の複製可能な組換え体 DNA で形質転換された微生物または細胞は、前述のとおり、組換え体 DNA に与えられた少なくとも 1 種の表現型によって形質転換されずに残った細胞から選別される。表現型は少なくとも 1 種のマーカー遺伝子を組換え体 DNA に挿入することによって与えることができる。また、複製可能な発現ベクターが本来有しているマーカー遺伝子を利用することもできる。マーカー遺伝子の例としては、例えば、

主細胞として用いる宿主-ベクター系を使用することができる。真核細胞の例としては前述の動物細胞株などの細胞が挙げられる。本発明の DNA を前述の真核細胞で発現させるために、本発明の組換え体 DNA は一般に遺伝子発現を制御するための機能配列、例えば、複製起點、本発明の DNA の上流に位置すべきプロモーター、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位や転写終止配列を含有している。本発明の DNA を真核細胞内で発現させるのに用いることのできるそのような機能配列はウイルスやウイルス性物質から得ることができる。

例えば、本発明で用いることのできるプロモーターはアデノウィルス 2、ポリオーマウィルス、シミアンウィルス 40 (SV40) などから得ることができる。特に、アデノウィルス 2 の主軸抑制プロモーターや SV40 の初期および後期プロモーターが好ましい。また、トロンビンのプロテイン C 活性化を促進する作用を有するヒト肺由来のペプチドをコードする遺伝子の上流の位置に本來

- 56 -

ネオマイシン耐性などの薬剤耐性遺伝子やジヒドロ葉酸レダクターゼ (以下 "DHFR" と称する) をコードする遺伝子などが挙げられる。これに關し、DHFR 遺伝子をマーカー遺伝子として用いる場合、DHFR には様々なタイプがあるため、その使用するマーカー遺伝子のコードしている DHFR のタイプによって用いるべき宿主を選択しなければならない。例えば、マーカー遺伝子として野生型 DHFR をコードする遺伝子を用いる場合、宿主としては DHFR 欠損株を用いるのが好ましい。DHFR 欠損株はヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを要求するので、ヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを含まない培地中では成育できない。しかしながら、DHFR 欠損株を DHFR 遺伝子を含有する組換え体 DNA で形質転換すると、その株はもはやヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを要求しなくなり、ヒボキサンチン、グリシン及びチミジンを含まない培地中でも成育することができる。従って、形質転換細胞は、ヒボキサンチン、グリシン及びチミジンに

についての栄養要求性を判断基準にして形質転換されないので残った細胞から容易に選択することができる。

一方、メトトレキセート(MTX)に対する親和性の低い変異体DHFRをコードする遺伝子(以下"MTX耐性DHFR遺伝子"と称する)をマーカー遺伝子として用いる場合には、宿主細胞は正常なDHFRをコードする遺伝子を有していればよくDHFRを欠損している必要はない。その理由は以下のとおりである。正常DHFRはMTXによって阻害されるため、正常DHFRをコードする遺伝子を含有する宿主細胞はMTXの存在下ではヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを要求する。しかしながら、その宿主細胞がMTX耐性DHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると形質転換細胞はMTX存在下においてももはやヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを要求しない。従って、形質転換細胞は、MTX存在下におけるヒポキサンチン、グリシン及びチミジンについての栄養要求性を判断基準と

- 59 -

の遺伝子のプロモーターやアルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関与する酵素、マルトース及びラクトースの利用に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらのうち、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関与する酵素類、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びラクトースの利用に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターは、これらのプロモーターによる転写を宿主の培養条件を変えることによって制御することができるので有利である。

酵母細胞中における転写や翻訳を制御するための複数起點や終止コドンおよびその他のDNA配列としては、酵母細胞に適している通常の公知のDNA配列を用いることができる。形質転換した微生物または細胞は通常の栄養培地を用いて通常の公知の方法で培養することにより本発明のペプチドをコードするDNAを発現して本発明のペ

- 61 -

して用いて形質転換されていない細胞から選択することができる。これに加し、真核細胞の大多数がMTX感受性であるのでMTX耐性DHFR遺伝子はマーカー遺伝子として用いるのに好都合である。

サッカロミセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)などの酵母も本発明のDNAを発現するための宿主として用いることができる。酵母で本発明のDNAを発現するためには複数可能な発現ベクターとして例えばプラスミドYRp7を用いることができる。プラスミドYRp7はctrp1遺伝子を含有しており、このctrp1遺伝子をマーカー遺伝子として利用することができる。

酵母細胞用の発現ベクターのプロモーターの例としては、3-ホスホグリセレートキナーゼまたはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルバートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、グルコキナーゼ、などの解糖系に関与する酵素類

- 60 -

ペプチドを製造することができる。培養後、本発明のペプチドは形質転換体の培養物から通常の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィーなどを用いて単離することができる。

このようにして得られたペプチドは様々な種類と長さの糖鎖を少なくとも1種含有していてもよい。得られたペプチドが糖鎖を含有しているか否かは用いる宿主細胞の種類によって異なる。また、ペプチドが糖鎖を含有している場合の糖鎖の種類や長さも用いる宿主細胞の種類によって異なる。

一般に翻訳開始シグナルのATGから翻訳されたペプチドは宿主細胞から分泌されると同時にプロセッシングを受けて成熟蛋白になることが知られている。本発明のペプチドの場合もそのようなプロセッシングを受けることがある。ペプチドがプロセッシングを受ける部位は、宿主により、または培養条件により変化する場合がある。例えば、本発明のペプチドが、式(1)で表されるペプチドとN末端アミノ酸配列として前述の18個のアミノ酸からなるリーダー配列とを含むプロセッシ

ングを受けていない未成熟形で形質転換細胞中で產生される場合、その未成熟形ペプチドはプロセッシングを受けてリーダー配列が削除されて成熟形となることがある。しかしながら、前述のように未成熟形ペプチドのプロセッシングを受ける位置は使用する宿主の種類や宿主の培養条件により変化するので必ずしも上記のようなプロセッシングが起きるとは限らない。

前述のとおり、本発明のペプチドは組換えDNA技術を用いる方法により製造することができる。また、本発明のペプチドは通常の公知の方法により、例えば市販の自動ペプチド合成装置などを用いて有機合成により製造することもできる。本発明のペプチドはトロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有する。プロテインCは血液凝固線溶機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンビンの作用により活性化される。活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系補酵素の活性型第V因子、および活性型第VII因子を失活させ、また血栓溶解

- 63 -

のに適した医薬組成物を調製することができる。本発明のペプチドは注射剤等として用いることができる。注射剤として用いる場合は、ショ糖、グリセリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの増粘剤、各種無機塩のpH調整剤などを添加剤として加えることができる。

本発明の生理活性物質の成人1回当たりの投与量は年齢、性別、体重、症状等により異なるが、一般に約0.1~200mgであり、一日当たり1回または必要に応じて数回投与する。

(以下余白)

作用を有するプラスミノーゲンアクチベーターの產生に関与していることが知られている。〔鈴木宏治、医学の歩み、第125、901頁、(1983年)〕。本発明のペプチドは、このトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテインCを大量に產生せしめるものである。従って、本発明のペプチドは生体における抗血液凝固及び血栓溶解に大きく寄与するものである。

前述のように、本発明のペプチドは抗血液凝固作用と血小板凝聚抑制作用及び血栓溶解作用を有するので例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血栓症、固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中塞栓症等の疾患の治療及び予防に用いることができる。本発明のペプチドを上記の疾患の治療に用いる際には薬剤として使用可能な粗体と混合することができる。即ち、上記の疾患を治療または予防するのに有効な量の本発明のペプチドを適当な量の粗体と混ぜて、患者に効果的に投与する

- 64 -

本発明をより詳細に記述するために参考例及び実施例により説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例にのみ限定されるものではない。

【参考例】

参考例1

(プロテインC活性化を促進する作用の測定)

本発明のペプチドのプロテインC活性化の促進作用の測定は、合成基質、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (Boc及びMCAはそれぞれレブトキシカルボニル基及び4-メチルクマリル-7-アミドの略称である)を用いる公知のプロテインC測定法〔ワイ・オーノ(Y.Ohno)ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.)、80巻、1387頁(1981年)〕に従って行なった。すなわち、0.5μMのプロテインCおよび80nMトロンビンを含有する水溶液5μlに本発明のペプチドを含む水溶液5μl(0~0.01A280/nM)を加え、これにNaCl、CaCl₂、血清アルブミン及びトリス塩酸緩衝液(pH7.4)をそれぞれ最終濃度が0.15M、2.5nM、1mg/nM及び20nMになるように、そして全量が

30 μ lとなるように加えた。得られた混合物を37°Cで15分間反応させてプロテインCを活性化した後に2 μ MのアンチトロンビンIIIを10 μ l及び10単位/ μ lのヘパリンを含有する水溶液を10 μ l加えて37°Cで15分間加熱して反応を停止させた。得られた反応混合物に、前述の合成基質Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA(財団法人蛋白質研究奨励会ペプチド研究会(Peptide Institute)(日本)製)200 μ Mを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)250 μ lを加え、37°Cで10分間反応させた後、20%酢酸0.5 μ lを加えて反応を停止させ、遊離してきたAMC(7-アミノ-7-メチルクマリン)の濃度を励起波長380 nm、発光波長440 nmで蛍光分光光度計RF-540型(島津製作所製、日本)により測定した。得られた蛍光強度を既知濃度のAMCの蛍光強度と比較して、遊離したAMC量を求めた。値は1分間当たりに生成するAMC量を表わす。このAMC量から本発明のペプチドを含まない水溶液を加えたときのAMC量を引いた値がサンプルのトロンビンによるプロテインC活性化を促進する強さを

- 67 -

化を促進する作用のあるグリコペプチドの精製)プロテインC活性化を促進する作用のあるグリコペプチドは、以下のようにしてヒト肺より抽出して得た。公立病院より提供されたヒト肺標本約800 gをはさみで約1 cm四方程度の大きさに細切りした後、得られた組織片に1 mMのDMP(diisopropyl fluorophosphate)を含む4°Cに冷却した500 mlの生理食塩水を加え、ワーリングブレンダーとしてAce Homogenizer AM-1型(日本精器会社製、日本)を用いて4°Cで5分間、ホモジナイズした。ホモジナイズ後、混合物を氷中で5分間冷却した。次に混合物を更に4°Cで5分間、ホモジナイズし氷中で5分間冷却した。上記のホモジナイズ及び冷却操作を更に3回くり返した。得られたホモジエートを12,000 gで4°Cにおいて30分間遠心分離にかけて上澄液とペレットに分け、ペレットを集める。これに0.5% (v/v) トリトンX-100、0.25 M蔗糖、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5 mM CaCl₂を含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)100 mlに懸濁し、ワーリングブレンダーを用いて4°C

示す。

ここで、プロテインCはヒト血しょうから鈴木らの方法[鈴木(Suzuki)ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、258巻、1914頁、(1983年)]で精製した。

また、ヒトトロンビンはランドブラッド(Lundblad)らの方法[ランドブラッド(Lundblad)ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem.Biophys.Res.Commun.)、66巻、482頁、(1975年)]で精製した。

参考例2

(1) : (ヒト肺cDNAライブラリーの入手)
ヒト肺のポリ(A) RNAより精製したバクテリオファージ λ gt₁₀cDNAライブラリーは、米国、クローンテック社(ClonTech Laboratories, Inc., 822 Industrial, Ave. Palo Alto, CA94303)より購入した(カタログ番号HL1004)。

(2) : (トロンビンによるプロテインC活性

- 68 -

で5分間、5回ホモジナイズして細胞抽出物を得た。

得られた抽出物を35,000 g、10°Cで60分間遠心分離にかけて上澄液を集めた。エヌ・エル・エスモン(N.L.Smon)ら[ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、257巻、859頁(1982年)]の方法に従って作成したDIP-トロンビン[ジイソプロピルホスフォロトロンビン(diisopropylphosphoro-thrombin)]を、ビーカー・クオトレカサス(P.Cuatreceas)の方法[ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、245巻、3059頁(1970年)]の方法に従ってプロムシアン化したアガロースに結合させて、DIP-トロンビン-アガロースを作成した。

次にDIP-トロンビン-アガロースを2.5 cm ϕ × 10 cmの大きさのカラムに充填してDIP-トロンビン-アガロースカラムを作成し、室温で0.1 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5% (v/v)Lubrol PX(半井科学薬品製、日本)を含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)でカラ

ムを平衡化した。次いで、上記の抽出上澄液をカラムに供した。カラムを0.3 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄した後、1 M NaCl、0.1 mM EDTA、1 mMベンズアミジン塩酸 0.5%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出して2.0mlずつフラクションを集めた。溶出によって得られる各フラクションについて前記の方法でトロンビンのプロテインC活性化能を測定した。同時に島津製作所(日本)製スペクトロフォトメーター-UV-240を用いて各フラクションの波長280nmにおける吸光度(A₂₈₀)を測定した。

プロテインC活性化能のある部分を回収し、0.1 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、0.05%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析した。得られた透析液を2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。即ち、透析液を1.5cmφ×10cmの大きさのDIP-トロンビン-アガロースカラムに供し、0.4 M NaCl、

- 71 -

0.5 mM CaCl₂、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、1 M NaCl、0.5 mM EDTA、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出した。溶出して得られるフラクションは1.8 mlずつ集めた。

この第4回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを第1図に示す。フラクションナンバー48番目から56番目までを回収した。

このようにして精製されたフラクションの吸光度から、得られた精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならう10.0(E_{1cm,280nm}=10.0)と規定してそれに基づき本精製品の量を計算したところ約500μgであった。なお得られた精製部分をポリアクリルアミドゲル濃度5~10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を50Vの電圧で2時間行ない、銀染色によってバンドを観察したところ単一バンドのみ確認された。

また、この精製タンパク約10μgを200mMの

0.5 mM CaCl₂、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、さらに0.4 M NaCl、0.1 mM EDTA、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄し、次いで1 M NaCl、0.5 mM EDTA、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出した。プロテインC活性化能のある部分を回収し、さらに0.1 M NaCl、0.05%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析した。得られた透析液を3回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。カラムの大きさ、洗浄条件および溶出条件は2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの条件と全く同じ条件で行なった。なお、溶出して得られるフラクションは2 mlずつ集めた。プロテインC活性化能のある部分を回収し、0.1 M NaCl、0.05%(v/v)Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析した後、0.8cmφ×8cmの大きさの4回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。0.35 M NaCl、

- 72 -

NaClを含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析後、同じ緩衝液で平衡化したConAセファロース(ファルマシア社製、カタログ番号17-0440)のカラム(樹脂量約1g)に供し、同じ緩衝液で充分洗浄したところ、このタンパクはConAセファロースに吸着して洗浄液中には溶出されなかった。

次いで0.5 Mのメチル-α-D-マンノピラノシド(Methyl-α-D-mannopyranoside)(米国Sigma社製、カタログ番号M-6882)を含む以外は上記と同じ緩衝液を通したところ、このタンパク質は溶出した。従って、このタンパク質は糖を含むいわゆるグリコペプチドであることがわかった。

(3) : (トロンビンのプロテインC活性化を促進するグリコペプチドのアミノ酸配列分析)

このグリコペプチドのアミノ酸配列は以下の様にして分析した。

精製したグリコペプチドを0.1%(v/v)ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液で室温で16時間透析してアミノ酸配列分析用試料とする。アブライド

バイオシステムズ社(米国)製アミノ酸シーケン

- 73 -

シングアナライザー(モデル470A)を用い、アール・エム・ヘウイック(R.M.Hewick)らの方法[ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、256巻、7000頁、(1981年)]に準じて、N末端より順次エドマン分解を行なった。遊離してくるフェニルチオヒダントイン・アミノ酸を、スペクトロフィジクス社(米国)製高速液体クロマトグラフィー用装置(SP8100)および米国デュポン社製ゾルバックスODSカラムを用いて分析を行ない、アミノ酸配列を決定した。その結果、アミノ酸配列の一部が明らかになり、N末端より11個目までは下記アミノ酸配列を有するものであることがわかった。

Ala-Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln
(4) : (N末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブの作成)

トロンビンによるプロテインC活性化を促進するグリコペプチドのN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブは、前述のN末端アミノ酸配列より、ヒト由来遺伝子においてアミノ酸をコード

- 75 -

(Maniatis E.F., et al)、モレキュラークローニング(Molecular Cloning)、122頁、1982年]の記載にしたがって、T.DNAキナーゼ、および $\gamma^{32}P$ -ATPを用いてラベル化した。

(5) : (トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用のあるグリコペプチドの抗体)

トロンビンのプロテインC活性化を促進する作用のあるグリコペプチドに対するウサギ抗体は、前述のようにして精製したトロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用のあるヒト肺由来のグリコペプチドを用いて、成書(エル・ハドソンら(L.hudson et al.)、ブラックティカル・イムノロジー(Practical Immunology)、8頁(1976年)、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ(Blackwell Scientific Publications))に従って作成した。

この抗体がトロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用のあるヒト肺由来のグリコペプチドと反応することを以下の様にして確認した。すなわち、参考例2-(2)に記載の方法で得た

ドする塩基配列の塩基の使用頻度を考慮して[ニュークリック・アンド・リサーチ(Nucleic Acid Res.)、8巻、R43頁、(1981年)]、N末端からのアミノ酸配列をコードする塩基配列として、5' CTG CG AGCGG CGGGG CTGGG GCTCG GCGGGGGGC 3' の33merを、また大塚ら[イー・オーツカ・エト・アール(E.Ohtsuka, et al.)、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、第260巻、2605頁、1985年]に従って、デオキシノシン("1"で示す)をデミジル酸の代りに用いてN末端からのアミノ酸配列をコードする塩基配列として、

- (1) 5' GCICC IGGIG AACCI CAGCC IGG 3'
- (2) 5' GCICC IGGIG AGGCI CAACC IGG 3'
- (3) 5' GCICC IGGIG AGGCI CAGCC IGG 3'
- (4) 5' GCICC IGGIG AACCI CAACC IGG 3'

の4種類の23merを米国アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製の380A型DNA合成機で合成し、メーカー・マニュアルにしたがって精製し、実験書[イー・エフ・マニアティスら

- 76 -

精製タンパクの約10 ngをニトロセルロースのフィルターにスポットする。よく風乾した後、この抗体を一次抗体としてニトロセルロースフィルター上のタンパクと反応させ、次いでヤギで調製したビオチン化抗ウサギIgG(ザイメッド・ラボラトリーコーポレーション、米国、カタログ番号62-1840)を二次抗体として反応させた後、アビジン・ビオチン化した西洋ワサビ由来ペーオキシダーゼ(アマシャムジャパン社製、日本、カタログ番号RPN-1051)を作用させる方法で発色させると黒褐色のスポットを与えた。

(6) : (ヒトさい帯内皮細胞の採取及び培養)

ヒトさい帯内皮細胞はディスバーゼII(合同精製、日本)を用いるマノらの方法[ワイ・マノら(Y.Mano, et al.)、エクスペリエンシア(Experientia)、第39卷、第144頁、(1983年)]に従って、私立病院より提供された新鮮なヒトさい帯から、た静脈より採取し培養した。

（以下余白）

考例 3

(組換え体DNAの取得)

(1) : (ポリ(A)⁺ RNAの調製)

ヒト内皮細胞よりチャーギンらの方法(ジェイ.エム.チャーギンら(Chirgwin, J.M. et al.)、バイオケミストリー(Biochemistry)、第18巻、5284頁(1979年))に従ってポリ(A)⁺ RNAを調製した。

(2) : (ヒト肺cDNAライブラリーよりのスクリーニング)

ヒト肺のポリ(A)⁺ RNAより調製したcDNAをバクテリオファージλgt₁₀に組み込んだcDNAライブラリー(クローンテック社製、米国)をそのままのマニュアルに従ってイー.コリ(*E. coli*)Y1080(クローンテック社製、米国)に感染させたものをLB培地プレート上に15cm径プレート1枚当たり約10万plaques程度になる様に移植した。42°Cで3.5時間培養後、あらかじめ10 mMのIPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)に浸してから乾燥させたニトロセルロースフィルター(BA85メンブランフィルター、シュライヒャー・アンド・シェル

- 79 -

3が参考例2-(4)で調製したN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとハイブリダイズするか否かを実験書(シルハービィ(Silhavy)ら、エクスペリメンツ・ウイズ・ジーン・フェージョンズ(Experiments With Gene Fusions)、181頁、(1984年)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory))に従って実施した。DNA断片TM13はいずれのN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブともハイブリダイズしないことがわかった。

(4) : (TM13の塩基配列)

参考例3-(2)で得られるクローンが含有するDNA断片TM13の塩基配列をサンガーらの方法(サンガー、エフ.ら(Sanger, F. et al.)、プロセーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、74、5463頁(1977年))にしたがって決定した。結果を第2図に示す。

(5) : (DNA断片TM13をプローブとしたヒト肺cDNAライブラリーのスクリーニング)

社製、西欧)をプレートの上に載せ、37°Cで3.5時間インキュベートして、ペプチドをIPTGで誘導発現させてニトロセルロースフィルター上にうつしとる。このニトロセルロースフィルターに、マニュアルに従って、ウサギで調製したトロンビンのプロテインC活性化を促進する作用を有する参考例2-(5)で得られたグリコペプチドに対する抗体を一次抗体として反応させ、次いでヤギで調製したビオチン化抗ウサギIgG(ザイメッド・ラボラトリー社製、米国、カタログ番号82-1840)を二次抗体として反応させた後、アビシン・ビオチン化した西洋ワサビ由来バーオキシダーゼ(アマーシャム・ジャパン社製、日本、カタログ番号RPN-1051)で発色させて、陽性のクローンを単離した。この陽性クローンの保有する組換え体cDNA/λgt₁₀に含まれるcDNA断片をTM13と称した。

(3) : (N末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーション)

参考例3-(2)で得られたDNA断片TM1

- 80 -

DNA断片TM13を制限酵素KpnIおよびPvuIIで消化して約440塩基対のDNA断片を得、これをニックトランスレーション法で³²Pで標識した。このDNA断片をプローブとしてヒト肺cDNAライブラリーよりブラークハイブリダイゼーションを行なって陽性のクローンをスクリーニングした。すなわち、常法に従ってクローンTM13のDNAをKpnIおよびPvuIIで消化してポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、抽出、精製して約440bpの精製断片約500ngを得た。このDNAをアマーシャム・ジャパン(日本)社製のニックトランスレーション・キット(カタログ番号N-5000)を用いて、それに添付のユーザー・マニュアルに従ってα-³²P-dCTPを用いて標識した。

この³²Pで標識したDNA断片をプローブとして実験書(マニアティス(Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、320頁、1982年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory))に従ってヒト肺cDNAライブラリーのブラークハ

- 81 -

ハイブリダイゼーションを行なった。

陽性のクローンを単離し、そのクローンが含有する組換え体を各種制限酵素で解析したところ、得られた組換え体にはTM13よりも前記ペプチドのN末端側の塩基配列をコードしていると思われる約2400bpのDNA断片が組み込まれていることがわかった。このDNA断片をTM137と称した。

(6) : (DNA断片TM137の塩基配列)

前記(5)で得られたDNA断片TM137の塩基配列を参考例3-(4)に記載の方法と同様に決定した。結果を第3(a)-(d)図に示す。

この結果より、DNA断片TM137は、参考例2-(3)に記載したN末端アミノ酸配列をコードする塩基配列を含まないことがわかった。

(7) : (プライマー・エクステンション)

参考例3-(4)で得られたDNA断片の塩基配列のうち、DNA断片TM13のN末端側の配列を基に3種類の合成DNAを参考例2-(4)に記載と同様にして作成し、HTM131、HT

- 83 -

に約27ng/μlのHTM133溶液20μlを加え65℃で20分間加熱後、室温にまで約1時間かけて冷却した。それ以降は、cDNA合成システム(アマシャム・ジャパン社、日本、カタログ番号RPN1256)を用いて、そのマニュアルに従ってcDNAを合成した。但し、cDNA合成システムに入っているオリゴ(dT)プライマーのかわりにHTM133を用いて実施した。

合成されたcDNAは実験書【マニアティス(Manatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、241頁、1982年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)】に従って両末端にCT末端をつけ、両末端にG末端をつけたpBR322(ATCC37017)と組合し、65℃、5分間加熱後57℃、2時間加熱した後、ゆっくりと室温に戻した後大腸菌K12MC1061(バックマン・シティ・オブ・ホープ・メディカル・インスティテュート、米国より入手)を形質転換した。詳しくは、大腸菌K12MC1061株のコロニーをLB培地を用いて、550nmにおける吸光度

M132、HTM133と命名した。なお、合成DNAの設計に当っては、ヒトさい帯内皮細胞より調製したmRNAとハイブリダイズする側の塩基配列を利用した。各合成DNAの塩基配列は以下のとおりであり、それらの合成DNAが対応するDNA断片TM13での位置を第2図に、またTM137での位置を第3図に示した。

HTM131:

5' GACCCAGAGGTAGCTAGTT 3' (20mer)

HTM132:

5' AACATCTGGCACCTG 3' (15mer)

HTM133:

5' GACAGGCAGTCTGGTJGCCAA 3' (20mer)

次にこのHTM133をプライマーとして参考例3-(1)に記載した方法で得たヒトさい帯内皮細胞より調製したポリ(A)⁺RNAをもちいて、いわゆるプライマー・エクステンション(Primer Extension)法を行なって、DNA断片TM137のさらに5'上流部分を合成した。

すなわち、約1μg/μlのポリ(A)⁺RNA5μl

- 84 -

が0.3になるまで培養した。該培養物50mlを集め、25mlの10mM RbClを含む10mM 3-(N-モルホリノ)プロパン-スルホン酸(MOPS)(pH7.0)溶液で洗浄し、次いで50mM CaCl₂、10mM RbClを含む25mlの0.1M MOPS(pH6.5)に再び懸滴した。

得られた懸滴液を30分間水冷し、遠心後、上澄を除去し、30μlのDMSOおよび50mM CaCl₂と10mM RbClを含む2.0mlの0.1M MOPS(pH6.5)の混合液中に懸滴させた。懸滴液を200μlずつ分注し、前述のプラスミドDNA溶液10μlをそれぞれに加えた。

該混合液を30分間水冷した後、44℃で60秒ヒートショックを与え、ただちに、あらかじめ37℃に温めておいた5mlのLB培地を加えた。この培液を37℃で1時間培養した後、それぞれの培液を遠心し、上澄を除去し、細胞ペレットを得た。該細胞ペレットにLB培地を加え、攪拌した後、懸滴液とした。該懸滴液を5μg/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天プレートにまき37℃で1夜培養を行なった。

- 160 -

- 85 -

このようにして、られるcDNAバンクより、参考例2-(4)に記載した方法に従って5'末端を³²Pで標識したHTM131及びHTM132をそれぞれプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを参考例3-(3)と同様の方法で実施した。

コロニーハイブリダイゼーションで約70,000個の形質転換体をスクリーニングしてHTM131及びHTM132の両者のプローブと反応するコロニーが6クローニングされた。この6クローニングから、実験書〔マニアティス(Hanisakis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 366頁、1982年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)〕に従ってプラスミドDNA(これを“pTMP5”と称する)を開製し、各種の制限酵素を用いて切断し、電気泳動で解析したところ、6クローニングから得られたプラスミドDNAは全て同一であり、約800bpの大きさのDNA断片とベクターからなることがわかった。このDNA断片をTMP5と

- 87 -

HTM134、HTM135、HTM136の3本の20merの合成DNAを作成する。これらの合成DNAと対応するDNA断片TMP5における位置を第4図に示す。

参考例3-(7)に記載の方法と同様にしてプライマー・エクステンションをHTM136をプライマーとし、HTM134、及びHTM135をプローブとして実施した。約50,000個の形質転換体から、HTM134、及びHTM135とハイブリダイズする形質転換体が一種類得られた。この形質転換体が保有する組換え体に含まれているDNA断片をTMP26と命名した。

(11) : (DNA断片TMP26とN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーション)

参考例3-(3)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP26がN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとハイブリダイズするか否かを調べた。

その結果、DNA断片TMP26は参考例2-

命名した。

(8) : (DNA断片TMP5とN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーション)

参考例3-(3)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP5がN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとハイブリダイズするか否かを調べた。

DNA断片TMP5はいずれのN末端DNAプローブともハイブリダイズしない、つまりN末端アミノ酸配列部分をコードしていないことが分かった。

(9) : (DNA断片TMP5の塩基配列)

参考例3-(4)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP5の塩基配列を決定した。結果を第4(a)-(b)図に示す。

(10) : (第2回目のプライマー・エクステンション)

参考例3-(7)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP5の塩基配列を基にしてHTM

- 88 -

(4)で合成した33merのN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブ及び4種の25merのプローブのミックスプローブとハイブリダイズした。つまり、DNA断片TMP26はN末端アミノ酸配列部分をコードしていることが分かった。

(12) : (DNA断片TMP26の塩基配列)

参考例3-(4)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP26の塩基配列を決定した。DNA断片TMP26のカルボキシル末端からの約540塩基の塩基配列を第5図に示す。

(以下余白)

(13) (DNA断片 TMP 26, TMP 5 及び TM 137 の接合)

参考例3-(1)~(12)で得られ、塩基配列を決定した4本のDNA断片 (TM 13, TM 137, TMP 5 及び TMP 26) のその塩基配列における対応関係および簡単な制限酵素地図を第6図に示す。第6図に示すようにDNA断片 TMP 26 に含まれるN末端アミノ酸配列をコードする塩基配列の上流にある最初のATGよりオープンリーディングフレームを組むとDNA断片 TMP 26, TMP 5 を通過して TM 137 の途中まで続く 1725 bp からなることが分かった。この各DNA断片にわたるオープンリーディングフレームをコードするDNA断片を得るためにDNA断片 TM P 26, TMP 5 及び TM 137 を次のようにして常法に従って組みあわせた。

(13-1) (DNA断片 TM 137 と TMP 5 の組みあわせ)

まず、λ Bl₁ の EcoRI サイトに挿入されているDNA断片 TM 137 を単離し、プラスミド p U

- 81 -

7より調製した約2,300 bp のDNA断片及びプラスミド p U C 1 8 T M P 5 より調製した約600 bp のDNA断片をプラスミド p U C 1 8 の BanHI および EcoRI で消化して調製したベクターに挿入してプラスミド p U C 1 8 T M J 1 を得た。

この工程を第7図に示す。

(13-2) (DNA断片 TM J 1 と TMP 26 の組みあわせ)

プラスミド p U C 1 8 T M J 1 を制限酵素 Dde I, Kpn I 及び BanIII で完全消化し、約950 bp 及び約1500 bp の断片を回収した。

一方、DNA断片 TMP 26 をプラスミド p U C 1 3 (ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号27-4854-01) の制限酵素 Pst I サイトに挿入してプラスミド p U C 1 3 T M P 26 を得た。これを Bba I で完全消化した後、切断末端をT. DNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、さらに制限酵素 Bgl II で完全消化して約170 bp のDNA断片を得た。

さらに別に、プラスミド p U C 1 3 T M P 26

C 1 8 (ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号27-4848-01) の EcoRI サイトに挿入してプラスミド p U C 1 8 T M 1 3 7 を得た。

次にプラスミド p U C 1 8 T M 1 3 7 を制限酵素 Hinc II, EcoRI で消化して4% (v/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、電気泳動抽出装置(日本、アート社製、MAX-YIELD[®])を用いて約2,300 bp のDNA断片を回収し、エタノール沈殿を行なって精製した。

一方、参考例3-(7)で得られた TMP 5 をプラスミド p B R 3 2 2 に組み込んだプラスミド p T M P 5 を Dde I で完全に消化した後、切断末端を E. coli DNAポリメラーゼ (Klenow P o l l 断片) を用いて平滑末端にして約800 bp のDNA断片を回収し、このDNA断片を p U C 1 8 の Sma I サイトに挿入してプラスミド p U C 1 8 T M P 5 を得た。次にこのプラスミド p U C 1 8 T M P 5 を制限酵素 BanIII および Hinc II で完全消化して約600 bp の BanIII-Hinc II 断片を得た。

以上の様にしてプラスミド p U C 1 8 T M 1 3

- 82 -

を Bgl II 及び Dde I で完全消化して約280 bp のDNA断片を得た。

次に上記の約170 bp、約280 bp、約850 bp のDNA断片を T. DNAリガーゼを用いて組みあわせ、制限酵素 Kpn I で消化した後、60 V の電圧で4°Cで2時間、1.3% 低融点アガロースゲル電気泳動にかけて精製単離し、約1400 bp のDNA断片を得た。

また別途、プラスミド p U C 1 8 を Sph I で完全に消化した後、E. coli DNAポリメラーゼで切断末端を平滑末端にした後、BanIII で完全消化してベクターを調製した。このベクターに上述の約1400 bp 及び約1500 bp のDNA断片を T. DNAリガーゼを用いて挿入して、プラスミド p U C 1 8 T M J 2 を得た。

この工程を第8図に示す。

参考例4 (ヒト染色体からの目的遺伝子のスクリーニング)

ヒト染色体ライブラリーからの目的遺伝子のス

クリーニングは以下のようにして実施した。

スファージのベクター EMBL-3 に入ったヒト染色体ライブラリーは米国クローンテック社 (Clontech Laboratories, Inc. 822 Industrial Ave. Palo Alto, CA94303) より購入した (カタログ番号HL1006)。このライブラリーより参考例 3- (2) で得られた DNA 断片 TM13 をプローブとして用いて参考例 3- (5) と同様の方法でスクリーニングを行なったところ、約 2 万 bp インサートを含有する染色体クローニングが 1 種類得られた。この染色体クローニングを制限酵素 BamH I で完全消化して 1.0% アガロースゲル電気泳動を行ない、実験書 [マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning), 382 頁、1982 年、コールド スプリング ハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)] に従ってサザン プロット ハイブリダイゼーションと同じプローブを用いて実施した。

その結果、約 4000 bp の DNA 断片に強い陽性のバンドを得たのでその断片を常法に従って単離し、

- 85 -

- 86 -

【実施例】

実施例 1

(プラスミド p SV2 TMJ2, p SV2 TM
D1, p SV2 TMD2, p SV2 TMD4 及び
p SV2 TMD5 の作製)

(1) プラスミド p SV2 TMJ2 の構築

プラスミド p SV2-dhfr (ATCC
37146) を Hind III 及び Bgl I で完全消化して SV40 の初期転写プロモーター及び SV40 の転写ターミネータを有するベクターを得た。つぎに参考例 2- (13-2) で作成したプラスミド p UCI8 TMJ2 を Hind III で部分消化した後 Bam H I で完全消化して約 2900 bp の DNA 断片を単離した。この DNA 断片を TMJ2 と称した。この 2900 bp の DNA 断片と上記の如く構築したベクターとを T4 DNA リガーゼを用いて組み合わせ、プラスミド p SV2 TMJ2 を得た。プラスミド p SV2 TMJ2 を構築する工程を第 8 図に示す。

得られたプラスミド p SV2 TMJ2 について

プラスミド p UCI8 の Bam H I サイトにサブクリーニングした。この約 4,000 bp の DNA の塩基配列を決定したところ、参考例 3- (13-2) で作成したプラスミド p UCI8 TMJ2 に押入されている DNA 断片の塩基配列と完全に一致することが分かった。

（以下余白）

はプラベスト条約の規定に基き、アメリカン タイプ カルチャー コレクション (ATCC) に寄託番号第 67283 号として寄託されている。

(2) プラスミド p SV2 TMD1 の構築

(a) DNA 断片 TMD1 の作製

前記工程 (1) で得られたプラスミド p SV2 TMJ2 を Nco I で完全消化した後、切断末端を E. coli I DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端にした。次いで Hind III で完全消化して約 1900 bp の DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を TMJ3 と称した。一方、ファージ M-13mp19 (宝酒造株式会社、日本、カタログ番号 31119) を Hind III 及び Hinc II で消化してベクターを構築した。このベクターに DNA 断片 TMJ3 を押入して組換え体プラスミド M-13mp19 TMJ3 を得た。

また別途、下記の塩基配列を有する削除用 DNA プローブ (以下 "ディリーター (deleter)" と称する) を有機合成した：

5'-GGAGGGCGCTCAGCCCGAATGCCACG-3' (25mer).

合成ディリーターをTMDと称した。

このようにして作成したディリーターTMDを用いて、メソッド イン エンザイモロジー (Method in Enzymology)、第100巻、468頁、(1983年)、アカデミックプレス (Academic Press)に記載の方法に従って部位特異的変異の手法で前記の如く得られた組換え体プラスミドM-13mp19TMJ13の177塩基からなる部分の削除を行った。すなわち、2.5pmolのディリーターTMD及び1.0pmolのM13プライマーM3(ユニバーサルプライマー、宝酒造株式会社製、カタログ番号3831)の5'末端をT,キナーゼを用いてリン酸化した後、0.5pmolの組換え体プラスミドM13mp19TMJ3のシングルストランドDNAを加え、85°Cで5分間加熱後、室温にまで冷却した。次いで5単位のE. coli DNAポリメラーゼI (Klenow Fragment)、及び1.0単位のT,DNAリガーゼを混合物に加えて37°Cで30分間インキュベートして混合物中に組換え体プラスミドを生成させた。得

- 89 -

ムの水溶液)を用いてニトロセルロースフィルターを洗浄した。洗浄は室温で、5分間、2回洗った後、55°C、65°C、75°C、と段階的に温度を上げていって、それぞれ5分間2回ずつ洗った。X線フィルムXAR-5(イーストマン コダック社製、米国)を得られニトロセルロースフィルターに密着させて-80°C、一夜露出させたところ、X線フィルム上に強く露光した黒いスポットが数10個検出された。各スポットは組換え体プラスミドで感染したクローンに対応するものである。そのうち、6クローンを選択し、各クローンの組換え体プラスミドを単離して制限酵素解剖、及び塩基配列の解析を行ったところ、これらのクローンの保有する組換え体プラスミドは制限部位と塩基配列がそれぞれ同一であることがわかった。得られた組換え体プラスミドをM13-TMD1と称した。更にこの組換え体プラスミドM13-TMD1は、開始コドン(ATG)と、その下流に498個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を含有する

られた場合をイー.コリ(E. coli)JM105(ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号27-1550)に加えた。それによってこのイー.コリを組換え体プラスミドでトランسفエクションした。37°Cで一夜培養して生じた寒天培地上のブラークをニトロセルロースフィルターに移しとり、80°Cで2時間加熱後、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションは6×SET(0.9M NaCl, 1.80 mMトリス緩衝液(pH 8.0), 6mM EDTA), 5×Denharts' [0.1%(w/v)フィコール(Ficoll), 0.1%(w/v)ポリビニルピロリドン, 0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)], 0.1% SDS, 100μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶被中で55°C、2時間加温することにより実施した。次いで上記の溶被中の変性サケ精子DNAのかわりに³²PでラベルしたTM-Dを加えた溶被を用いてハイブリダイゼーション反応を55°C、2時間実施した。次いで6×SSC(0.9M食塩、0.09Mクエン酸三ナトリウム

- 100 -

DNA断片を有することがわかった。この組換え体プラスミドM13-TMD1に含まれるDNA断片をTMD1と称した。第10回に組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3とディリーター-TMDとがハイブリダイズし、DNA断片TMJ3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。

(b) プラスミドpSV2TMD1の構築

実施例1-(2)-(a)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD1をHindIIIおよびBamHIで完全消化してTMD1の約1900bp DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD1とをT,DNAリガーゼを用いて組みあわせ、プラスミドpSV2TMD1を得た。

(3) プラスミドpSV2TMD2の構築

(a) DNA断片TMD2の作製

下記の塩基配列：

5'-CTCCACCGCTCCAGGGAAACCCAGG-3' (25mer) を有するディリーター-TMD₁をディリーター-TMDの代わりに削除用DNAプローブとして用いる以外は実施例1-(2)-(a)と実質的に同様の方法を繰り返して、TMD₂と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM1.3-TMD₂を得た。DNA断片TMD₂は実施例1-(2)-(a)で得られたDNA断片TMD₁の5'末端から678bpのDNAが削除された構造を有する。このDNA断片TMD₂は開始コドン(ATG)と、その下流に272個のアミノ酸からなる本邦明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図11に組換え体プラスミドM1.3-TMD₁とディリーター-TMD₁とがハイブリダイズし、DNA断片TMD₁に対応するDNA領域の一部が削除されるとところを示す。

(b) プラスミドpSV2TMD₂の構造

実施例1-(3)-(a)で作製した組換え体プラスミドM1.3-TMD₂をHindⅢおよびBamHⅠで完全消化してTMD₂の約1200bp

- 103 -

を有機合成した：

5'-GGAGGGCGCTAACAGTCGGTGCCA-3' (25mer)。

合成ディリーターをTMD₁と称した。

このようにして作成したディリーター-TMD₁用いて、メソッド イン エンザイモロジー (Method in Enzymology)、第100巻、468頁、(1983年)、アカデミックプレス (Academic Press)に記載の方法に従って部位特異的変異の手法で前記の如く得られた組換え体プラスミドM-13mp19TMJ₃の285bpからなる部分の削除を行った。すなわち、2.5pmolのディリーター-TMD₁及び1.0pmolのM1.3プライマーM3(ユニバーサルプライマー、宝酒造株式会社製、カタログ番号3831)の5'末端をT₄キナーゼを用いてリン酸化した後、0.5pmolの組換えプラスミドM1.3mp19TMJ₃のシングルストランドDNAを加え、95℃で5分間加熱後、室温にまで冷却した。次いで5単位のE. coli DNAポリメラーゼI (Klenow Fragment)、及び10単位のT₄DNAリガーゼを混合

- 105 -

DNA断片を準備した。一方、プラスミドpSV2-dhfr (ATCC 37146)をHindⅢ及びBamHⅠで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD₂とをT₄DNAリガーゼを用いて組合あわせ、プラスミドpSV2TMD₂を得た。

(4) プラスミドpSV2TMD₄の作製(a) DNA断片TMD₃の作製

前記工程(1)で得られたプラスミドpSV2TMJ₂をNcoⅠで完全消化した後、切断末端をE. coli DNAポリメラーゼを用いて平滑末端にした。次いでHindⅢで完全消化して約1900bpのDNA断片を得た。得られたDNA断片をTMJ₃と称した。一方、ファージM-13mp19(宝酒造株式会社、日本、カタログ番号31119)のHindⅢ及びHincⅡで消化してベクターを調製した。このベクターにDNA断片TMJ₃を挿入して組換え体プラスミドM-13mp19TMJ₃を得た。

また別途、下記の塩基配列を有するディリータ

- 104 -

物に加えて37℃で30分間インキュベートして混合物中に組換え体プラスミドを生成させた。得られた混合物をE. coli (E. coli) JM106(ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号27-1550)に加えた。それによりE. coliを組換え体プラスミドでトランスフェクションした。37℃で一夜培養して生じた寒天培地上のブラークをニトロセルロースフィルターに移しとり、80℃で2時間加熱後、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションは6×SET (0.9M NaCl, 180mMトリス緩衝液 (pH 8.0)、6mM EDTA)、5×Denharts' (0.1% (w/v) フィコール (Ficoll)、0.1% (w/v) ポリビニルビロリドン、0.1% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA))、0.1% SDS, 100μg/ml 褒性サケ精子DNAを含む溶液中で55℃、2時間加温することにより実施した。次いで上記の溶液中の褒性サケ精子DNAのかわりに³²PでラベルしたTMD₁を加えた溶液を用いてハイブリダイゼーション

- 106 -

ン反応を55℃、2時間実施した。次いで6×SC (0.9M食塩、0.09Mクエン酸三ナトリウムの水溶液)を用いてニトロセルロースフィルターを洗浄した。洗浄は室温で、5分間、2回洗った後、55℃、65℃、75℃、と段階的に温度を上げていって、それぞれ5分間2回ずつ洗った。X線フィルムXAR-5 (イーストマンコダック社製、米国)を得られたニトロセルロースフィルターに密着させて-80℃、一夜露出させたところ、X線フィルム上に強く露光した黒いスポットが数10個検出された。各スポットは組換え体プラスミドで感染したクローンに対応するものである。そのうち、6クローンを選択し、各クローンの組換え体プラスミドを単離して制限酵素解析、及び塩基配列の解析を行ったところ、これらのクローンの保有する組換え体プラスミドは制限部位と塩基配列がそれぞれ同一であることがわかった。得られた組換え体プラスミドをM13-TMD3と称した。更にこの組換え体プラスミドM13-TMD3は、開始コドン(ATG)と、

- 107 -

236個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第13図に組換え体プラスミドM13-TMD3とディリーター-TMD_dとがハイブリダイズし、DNA断片TMD3に対応するDNA領域の一部が削除されるとところを示す。

(c) プラスミドpSV2TMD4の構築

実施例1-(4)-(b)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD4をHindIIIおよびBamH Iで完全消化してTMD4の約1100bp DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr (ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD4とをT. DNAリガーゼを用いて組みあわせ、プラスミドpSV2TMD4を得た。

(5) プラスミドpSV2TMD5の構築

(a) DNA断片TMD5の作製

下記の塩基配列：

5'-CACGGGCTCACGGGGACCCCAAGG-3' (25mer)。

その下流に426個のアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を有するDNA断片を有することがわかった。この組換え体プラスミドM13-TMD3に含まれるDNA断片をTMD3と称した。第13図に組換え体プラスミドM13mp19TMJ3とディリーター-TMD_dとがハイブリダイズし、DNA断片TMJ3に対応するDNA領域の一部が削除されるとところを示す。

(b) DNA断片TMD4の作製

部位特異的変異の手法を用いてディリーター-TMD_dの代わりに実施例1-(3)-(a)で得られたディリーター-TMD_dを用いる以外は実施例1-(4)-(a)と実質的に同様の方法で、上述の如く得られた組換え体プラスミドM13-TMD3の一部を削除して、TMD4と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13-TMD4を得た。DNA断片TMD4は実施例1-(4)-(a)で得られたDNA断片TMD3の5'末端から678bpのDNAが削除された構造を有する。このDNA断片TMD4は開始コドン(ATG)と、その下流に

- 108 -

を有するディリーター-TMD_dをディリーター-TMD_dの代わりに削除用DNAプローブとして用いる以外は、実施例1-(4)-(b)と実質的に同様の方法を繰り返して、TMD5と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13-TMD5を得た。DNA断片TMD5は実施例1-(4)-(a)で得られたDNA断片TMD3の5'末端から1032bpのDNAが削除された構造を有する。このDNA断片TMD5は開始コドン(ATG)と、その下流に118個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第14図に組換え体プラスミドM13-TMD3とディリーター-TMD_dとがハイブリダイズし、DNA断片TMD3に対応するDNA領域の一部が削除されるとところを示す。

(b) プラスミドpSV2TMD5の構築

実施例1-(5)-(a)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD5をHindIIIおよびBamH Iで完全消化してTMD5の約740bp DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2

- 109 -

-d h f r (ATCC 37146) を Hind III 及び Bgl II で完全消化してペクターを得た。このペクターと DNA 断片 TMD 5 を T. DNA リガーゼを用いて組みあわせ、プラスミド p SV 2 TMD 5 を得た。

(以下余白)

実施例 3

(プラスミド p SV 2 TMD 5 による COS-1 細胞の形質転換)

COS-1 細胞 (ATCC CRL 1650)

を培養器中に入れた 10% (v/v) のウシ胎児血清 (以下 "FCS" と略す) を加えたダルベッコの最小必需培地 (以下 "MEM" と略す) (米国、フローラボラトリ (Flow Laboratories) 社製、カタログ番号 10-331) を用いて、37°C で 5% 炭酸ガスインキュベーター中で対数増殖期になるまで培養し、0.1% トリプシン及び 0.02% EDTA を用いて培養器に付着増殖した細胞を培養器よりはがして、ハンクス平衡塩漬液 (米国、フローラボラトリ (Flow Laboratories) 社製、カタログ番号 17-101-22) に約 1×10^7 個 / ml の濃度になるように懸濁した。

実施例 1- (5) で得られたプラスミド p SV 2 TMD 5 を約 $2 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ になるように 1 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。約 10 μg のプラスミド p SV 2 TMD 5 を含む得られ

- 111 -

たプラスミド懸濁液 $5 \mu\text{l}$ を 1.5 ml 容量のエッペンドルフ型試験管に入れ、次いでこの試験管に上述の如く得られた COS-1 細胞の細胞懸濁液 $200 \mu\text{l}$ を入れて 0°C で 10 分間放置した。試験管内の懸濁液を米国 D.E.P. SYSTEM 社製細胞融合装置 FPH1001 型のキュベットに移し、1.2 kV で $40 \mu\text{s}$ の条件で 2 回電気パルスを与えた。その後懸濁液を再び元のエッペンドルフ型試験管に移し、0°C で 5 分間放置した後、10% (v/v) FCS を加えたダルベッコの MEM 1.0 ml を以下のように用いて直徑 1.0 cm の組織培養用プレートに移した。即ち、少量の 10% (v/v) FCS を含むダルベッコの MEM を懸濁液に加えてその混合物を組織培養用プレートに移した。次いで、試験管を残りのダルベッコの MEM で数回洗浄して洗浄液を同じプレートに加えた。その後、プレートは 5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養した。

(トロンビンによるプロテイン C 活性化を促進する作用の確認)

培養終了後、プレートの培地を FCS を含まな

いダルベッコの MEM に交換し、48 時間培養した。培養上澄液を $5 \mu\text{l}$ 採取し、これを試料として参考例 1 に記載した方法で、プロテイン C 活性化の促進作用を測定した。

更に、直徑 1.0 cm の組織培養用プレート 1 枚分の細胞を米国コースター (Coaster) 社製セルスクレイパー (Cell Scraper) (カタログ番号 3010) を用いて擦き取って集め、800 rpm, 10 分間の条件で遠心分離して集める。このペレットを試料として用いて参考例 1 に記載した方法でプロテイン C の活性化を促進する作用を測定した。またコントロールとしてはプラスミド p SV 2-d h f r でトランスフォームした COS-1 細胞の培養上澄液及び細胞ペレットを試料として用いた。

結果を第 1 表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート 1 枚分に換算したものである。

(以下余白)

第1表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD5	培養上澄液	4300
(本発明)	細胞ペレット	6.8
pSV2-dhfr	培養上澄液	検出されず
(コントロール)	細胞ペレット	検出されず

実施例3

(プラスミド p SV 2 T M D 4 による C O S - 1 細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミド p S V 2 T M D 4 を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミド p S V 2 T M D 4 によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定した。結果を第2表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

第2表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD4	培養上澄液	4200
(本発明)	細胞ペレット	6.8
pSV2-dhfr	培養上澄液	検出されず
(コントロール)	細胞ペレット	検出されず

実施例4

(プラスミド p S V 2 T M D 2 による C O S - 1 細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミド p S V 2 T M D 2 を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミド p S V 2 T M D 2 によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定した。結果を第3表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

- 115 -

- 116 -

第3表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD2	培養上澄液	4000
(本発明)	細胞ペレット	7.0
pSV2-dhfr	培養上澄液	検出されず
(コントロール)	細胞ペレット	検出されず

実施例5

(プラスミド p S V 2 T M D 1 による C O S - 1 細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミド p S V 2 T M D 1 を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミド p S V 2 T M D 1 によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定した。結果を第4表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

第4表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD1	培養上澄液 (FCS+)	800
(本発明)	(FCS-)	1200
	細胞ペレット (FCS+)	1.8
	(FCS-)	3.6
pSV2-dhfr	培養上澄液 (FCS+)	検出されず
(コントロール)	(FCS-)	検出されず
	細胞ペレット (FCS+)	検出されず
	(FCS-)	検出されず

実施例6

(プラスミド p S V 2 T M J 2 による C O S - 1 細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミド p S V 2 T M J 2 を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミド p S V 2 T M J 2 によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化

の促進作用を測定した。その結果、細胞ペレットの試料が強いプロテインC活性化促進作用を示し、生成したプロテインCの量は約300ngであった。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-dhfrでトランスフォームした細胞ではこの活性は検出されなかった。

実施例7

(プラスミドpSV2TMD5によるCHO細胞の形質転換と形質転換細胞における発現)

約4μgのプラスミドpSV2-neo (ATCC 37150)、及び約20μgの実施例1-(5)で作成したプラスミドpSV2TMD5を混合してエタノール沈殿をした。沈殿物を風乾後、450μlのTE (pH 7.9, 1mMトリス塩酸緩衝液、0.1mM EDTA)に溶解し、500μlの2×HBS (50mM HEPES, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄, pH 7.12)を加えた。次いで50μlの2.5M CaCl₂を滴下し室温に10分間放置した。

- 118 -

沈培地の組成は前述の培地に400μg/mlになる様にジェネティシンG-418 (米国GIBCO社製、カタログ番号860-1811)を添加したものである。3~4日おきに培地交換を行いながら約2週間培養して、トランスフォームした細胞をクローニングした。この操作で得られた細胞のクローンをそれぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。途中、培地のFCS濃度を10%から1%に減らした培地に切り換えて培養した。このFCS含有選択培地で培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化を促進する作用を測定したところ、強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例8

(プラスミドpSV2TMD4によるCHO細胞

一方、10%(v/v)FCS及び1v/v%ベニシリン-ストレプトマイシン (米国、フローラボラトリー社製、カタログ号16-700-48)を含有するHam's F-12培地 (米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号10-421-20)を用いて直径6cmの組織培養用プレートにプレート1枚当たり細胞数約5×10⁴程度播種したCHO-K1株 (ATCC CCLD 61)を1夜培養し、培地を新鮮な培地に交換し、更に3時間培養した。このCHO-K1に前述のCaCl₂を滴下したプラスミドDNA溶液を重層し、37℃で約8時間培養した。5mlのPBS(-) (米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号28-103-05)を用いて2回洗浄し、さらに、5mlの前述の培地で洗浄後、新鮮な培地を加えて約16時間さらに培養した。

プレートに付着した細胞を0.25%トリプシン、0.02%EDTA溶液を用いてはがし、直径10cmの組織培養用プレート4枚に広げて培養した。24時間後、培地を選択培地に交換した。選

- 120 -

の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD4を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMD4によって形質転換された細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例9

(プラスミドpSV2TMD2によるCHO細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD2を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドpSV2

TMD 2によって形質転換された細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドp SV 2-neoだけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例10

(プラスミドp SV 2 TMD 1によるCHO細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドp SV 2 TMD 1を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドp SV 2 TMD 1によって形質転換された細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドp SV 2-neoだけで

トランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例11

(プラスミドp SV 2 TMD 2によるCHO細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドp SV 2 TMD 2を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドp SV 2 TMD 2によって形質転換された細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドp SV 2-neoだけで形質転換した細胞及びその培養上澄液では本活性は検出されなかった。

- 123 -

- 124 -

実施例12

(プラスミドp SV 2 TMD 5によるC₃...I細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(5)で作成したプラスミドp SV 2 TMD 5をHind IIIで完全消化した後、切断末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、T,DNAリガーゼを作用させ、プラスミドp SV 2 TMD 5のHind IIIサイトを消失したプラスミドp SV 2 TMD 5-1を得た。次いでこのプラスミドp SV 2 TMD 5-1をPvu II及びBam HIで完全消化して約1700 bpのDNA断片を得た。これをプラスミドp UCT 18のHinc II及びBam HIで完全消化したベクターに挿入してプラスミドp UCT TMD 5-1を得た。一方、プラスミドp BR 322 (ATCC 37017)からコバヌルビアスらの方法〔エル・コバヌルビアスら (L.Covasrubias et al.)、ジーン (Gene)、13、25、(1981年)に従

ってプラスミドp BR 327を作製した。得られたプラスミドp BR 327をBam HI及びHind IIIで消化して得た約2960 bpのDNA断片に、プラスミドp UCT TMD 5-1をBam HI及びHind IIIで完全消化して得た約2600 bpのDNA断片を挿入してプラスミドp BRT TMD 5-1を得た。このプラスミドp BRT TMD 5-1をHind IIIで完全消化したものをプラスミドp BPV-1 (B-1) (ATCC 37111)をHind IIIで完全消化して得た断片とをT,DNAリガーゼを用いて組いで、C₃...I細胞発現用のプラスミドp dB PVT TMD 5-1を得た。以上の工程を第15図に示す。

次に実施例7に記載の方法に準じてp dB PVT TMD 5-1でC₃...I細胞 (ATCC CRL 1616)をトランスフォームした。10% FCS及び1 v/v%ベニシリン-ストレプトマイシン (米国、フローラボラトリーコーポレーション、カタログ番号 16-700-49)を含むダルベッコのMEMで約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6個

- 125 -

- 170 -

- 126 -

得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径 10cm の組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地を FCS を含まない培地に置換して培養した。この培地で 1 日培養した培養液 50 μl をとり、これを用いて参考例 1 に記載した方法でプロテイン C 活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミド pBPV-1 (9-1) だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかつた。

実施例 13

(プラスミド pSV2TMD4 による C...I 細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテイン C 活性化の促進作用の測定)

実施例 1- (4) で作成したプラスミド pSV2TMD4 を Hind III で完全消化した後、切断末端を DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端にし、

- 127 -

1 (9-1) (ATCC 37111) を Hind III で完全消化して得た断片とを T. DNA リガーゼを用いて組いで、C...I 細胞発現用のプラスミド p dBPV TMD4-1 を得た。以上の工程を第 16 図に示す。

次に p dBPV TMD4-1 で実施例 7 に記載の方法に準じて C...I 細胞 (ATCC CRL 1616) をトランスフォームした。10% FCS 及び 1 v/v% ベニシリン-ストレプトマイシン (米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号 16-700-49) を含むダルベッコの MEM で約 3 週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が 6 個得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径 10cm の組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地を FCS を含まない培地に置換して培養した。この培地で 1 日培養した培養液 50 μl をとり、これを用いて参考例 1 に記載した方法でプロテイン C 活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いた

T. DNA リガーゼを作用させ、プラスミド pSV2TMD4 の Hind III サイトを欠失したプラスミド pSV2TMD4-1 を得た。次いでこのプラスミド pSV2TMD4-1 を Pvu II 及び Bam H I で完全消化して約 2100 bp の断片を得た。これをプラスミド pUC18 の Hinc II 及び Bam H I で完全消化したベクターに挿入してプラスミド pUCTMD4-1 を得た。一方、プラスミド pBR322 (ATCC 37017) からコパスルビアスらの方法 [エル・コパスルビアス (L. Covasrubias et al)、ジーン (Gene)、13、25、(1981 年) に従ってプラスミド pBR322 を Bam H I 及び Hind III で消化して得た約 2960 bp の DNA 断片に、プラスミド pUCTMD4-1 を Bam H I 及び Hind III で完全消化して得た約 3000 bp の DNA 断片を挿入してプラスミド pBRTMD4-1 を得た。このプラスミド pBRTMD4-1 を Hind III で完全消化したものとプラスミド pBPV-

- 128 -

プラスミド pBPV-1 (9-1) だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかつた。

(以下余白)

実施例14

(プラスミドpSV2TMD2によるC₁₁₁、I細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(3)で作成したプラスミドpSV2TMD2をHindIIIで完全消化した後、切断末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、T,DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMD2のHindIIIサイトを欠失したプラスミドpSV2TMD2-1を得た。次いでこのプラスミドpSV2TMD2-1をPvuII及びBamHIで完全消化して約2200bpのDNA断片を得た。これをプラスミドpUC18のHincII及びBamHIで完全消化したベクターに挿入してプラスミドpUCTMD2-1を得た。一方、プラスミドpBR322(ATCC 37017)からコバスルビアスらの方法(エル・コバスルビアスら(L.Covasrubias et al)、ジーン(Gene)、13、25、(1981年)に

-131-

記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、弱い活性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpBPV-1(8-1)だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例15

(プラスミドpSV2TMD1によるC₁₁₁細胞の形質転換および形質転換細胞の產生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(2)で作成したプラスミドpSV2TMD1をHindIIIで完全消化した後、切断

末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、T,DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpBR327をBamHI及びHindIIIで消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミドpUCTMD1-1を得た。このプラスミドpBRTMD2-1をBamHI及びHindIIIで完全消化して得た約3070bpのDNA断片を挿入してプラスミドpBRTMD2-1を得た。このプラスミドpBRTMD2-1をHindIIIで完全消化したものとプラスミドpBPV-1(8-1)(ATCC 37111)を得た。このプラスミドpBRTMD2-1をHindIIIで完全消化して得た断片とT,DNAリガーゼを用いて組いで、C₁₁₁細胞発現用のプラスミドpdBPTMD2-1を得た。以上の工程を第17回に示す。次にpdBPTMD2-1で実施例7に記載の方法に準じてC₁₁₁細胞(ATCC CRL1616)をトランスフォームした。10%FCS及び1v/v%ベニシリントレブトマイシン(米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号16-700-49)を含むダルベッ

-132-

末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、T,DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMD1のHindIIIサイトを欠失したプラスミドpSV2TMD1-1を得た。次いでこのプラスミドpSV2TMD1-1をPvuII及びBamHIで完全消化して約3100bpのDNA断片を得た。これをプラスミドpUC18のHincII及びBamHIで完全消化したベクターに挿入してプラスミドpUCTMD1-1を得た。一方、プラスミドpBR322(ATCC 37017)からコバスルビアスら(L.Covasrubias et al)、ジーン(Gene)、13、25、(1981年)に従ってプラスミドpBR327を作製した。得られたプラスミドpBR327をBamHI及びHindIIIで消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミドpUCTMD1-1をBamHI及びHindIIIで完全消化して得たDNA断片を挿入してプラスミドpBRTMD1-1を得た。このプラスミドpBRTMD1-1をHind

-133-

d IIIで完全消化したものとプラスミド p B P V - 1 (8-1) (ATCC 37111) を H in d IIIで完全消化して得た断片とを T. DNA リガーゼを用いて組いで、C,,, 細胞発現用のプラスミド p d B P V T M D 1 - 1 を得た。以上の工程を第18図に示す。

次に p d B P V T M D 1 - 1 で実施例7に記載の方法に準じて C,,, 1 細胞 (ATCC CRL 1616) をトランスフォームした。10% FCS 及び 1 v/v% ベニシリンーストレプトマイシン (米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号 16-700-40) を含むダルベッコの MEM で約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6倍増殖されたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径 10 cm の組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地を FCS を含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した培養液 50 μl をとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。

- 135 -

に挿入してプラスミド p U C T M J 2 - 1 を得た。一方、プラスミド p B R 3 2 2 (ATCC 37017) からコバスルビアスらの方法 (エル・コバスルビアスら (L. Covasrubias et al) 、ジーン (Gene) 、13、25、(1981年) に従ってプラスミド p B R 3 2 7 を作製した。得られたプラスミド p B R 3 2 7 を B am H I 及び H in d III で消化して得た約 2960 bp の DNA 断片に、プラスミド p U C T M J 2 - 1 を B am H I 及び H in d III で完全消化して得た DNA 断片を挿入してプラスミド p B R T M J 2 - 1 を得た。このプラスミド p B R T M J 2 - 1 を H in d III で完全消化したものとプラスミド p B P V - 1 (8-1) (ATCC 37111) を H in d III で完全消化して得た断片とを T. DNA リガーゼを用いて組いで、C,,, 細胞発現用のプラスミド p d B P V T M J 2 - 1 を得た。以上の工程を第18図に示す。

次に p d B P V T M J 2 - 1 で実施例7に記載の方法に準じて C,,, 1 細胞 (ATCC CRL

性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミド p B P V - 1 (8-1) だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例 16

(プラスミド p S V 2 T M J 2 による C,,, 1 細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(1) で作成したプラスミド p S V 2 T M J 2 を H in d III で完全消化した後、切断末端を DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端にし、T. DNA リガーゼを作用させ、プラスミド p S V 2 T M J 2 の H in d III サイトを欠失したプラスミド p S V 2 T M J 2 - 1 を得た。次いでこのプラスミド p S V 2 T M J 2 - 1 を P vu II 及び B am H I で完全消化して約 4100 bp の DNA 断片を得た。これをプラスミド p U C 1 8 の H in c II 及び B am H I で完全消化したベクター

- 136 -

1616) をトランスフォームした。10% FCS 及び 1 v/v% ベニシリンーストレプトマイシン (米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号 16-700-49) を含むダルベッコの MEM で約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6倍増殖されたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径 10 cm の組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地を FCS を含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した後、培養した細胞のペレットをかきとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミド p B P V - 1 (8-1) だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例 17

(本発明のペプチドの精製)

実施例8に記載した方法で培養したプラスミド

- 137 -

- 138 -

pSV2-neo及びプラスミドpSV2TMD5でトランスフォームしたCHO細胞を直径10cmの組織培養用プレート25枚で培養した。培地は1日おきに4回新鮮な培地と交換した。培養液をすべて集め(約100ml)、pH7.5に調整した後DIP-トロンビンーアガロースのカラムクロマトグラフィーにかけて精製した。

すなわち、エヌ・エル・エスモン(N.L.Brown)ら[ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem), 257巻, 859頁, (1982年)]の方法にしたがって作製したDIP-トロンビン[ジイソプロピルホスホロトロンビン(disopropylphosphorothrombin)]を、ピー・クオトレカサス(P.Cuatrececas)の方法[ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem), 245巻, 359頁, (1970年)]にしたがってプロムシアン化したアガロースに結合させてDIP-トロンビンーアガロースを作製した。

- 138 -

(v/v)Lubrol PX(半井化学製品製、日本)を含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析した。得られた透析液を2回目のDIP-トロンビンーアガロースカラムクロマトグラフィーに供した。即ち、透析液を1.5cmφ×10cmの大きさのDIP-トロンビンーアガロースカラムに通し、0.4M NaCl、0.5mM CaCl₂、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、さらに0.4M NaCl、0.1mM EDTA、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄し、次いで1M NaCl、0.5mM EDTA、0.1%(v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出した。活性画分を回収し精製品を-80°Cで凍結保存した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならない10.0(E_{1cm}¹⁸·280nm=10.0)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約4.7μgであった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアク

次にDIP-トロンビンーアガロースを2.5cmφ×10cmの大きさのカラムに充填してDIP-トロンビンーアガロースカラムを作製し室温で0.1M NaCl、0.5mM CaCl₂、1mMベンズアミジン塩酸、0.5%(v/v)Lubrol PX(半井化学製品製、日本)を含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)でカラムを平衡化した。次いで、上記の上澄液をカラムに供した。カラムを0.3M NaCl、0.5mM CaCl₂、1mMベンズアミジン塩酸、0.5%(v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄した後、1M NaCl、0.1mM EDTA、1mMベンズアミジン塩酸0.5%(v/v)Lubrol PXを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出して2.0mlずつフラクションを集めた。溶出によって得られる各フラクションについての前記の方法でプロテインC活性化の促進作用を測定した。同時に島津製作所(日本)製スペクトロフォトメーターUV-240を用いて各フラクションの波長280nmにおける吸光度(A₂₈₀)を測定した。活性のある画分を回収し、0.1M NaCl、0.5mM CaCl₂、0.5%

- 140 -

リルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ單一のバンドのみ確認された。

実施例18

プラスミドpSV2TMD4を用いる以外は実施例17と同様の操作を行い本発明のペプチドの精製品を得、波長280nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならない10.0(E_{1cm}¹⁸·280nm=10.0)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約4.5μgであった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ單一のバンドのみ確認された。

実施例19

プラスミドpSV2TMD2を用いる以外は実

実施例17と同様の操作を行い本発明のペプチドの精製品を得、波長280 nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならう $10.0 (E_{1cm}^{1\%} \cdot 280nm = 10.0)$ と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約4 μg であった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5~10%のグラジェントを用いる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例20

プラスミドpSV2TMD1を用いる以外は実施例17と同様の操作を行い本発明のペプチドの精製品を得、波長280 nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならう $10.0 (E_{1cm}^{1\%} \cdot 280nm = 10.0)$ と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約3 μg であった。

- 143 -

実施例17と同様の操作により本発明のペプチドの精製品を得、波長280 nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならう $10.0 (E_{1cm}^{1\%} \cdot 280nm = 10.0)$ と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約3 μg であった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5~10%のグラジェントを用いる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例22

(トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用の確認)

精製した本発明のペプチドのプロテインC活性化の促進作用を以下の方法にて評価した。

即ち、0.1 M NaCl、3.6 mM CaCl₂、10 mg/mlウシ血清アルブミンを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に50 $\mu g/ml$ のプロテインC、5 nMのトロ

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5~10%のグラジェントを用いる SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例21

実施例11に記載した方法で、プラスミドpSV2TMD2及びプラスミドpSV2-neoで形質転換したCHO細胞を直径10 cmの組織培養用プレート2枚を用いて培養した。培養後、培養物を800 rpmで10分間遠心分離にかけて細胞を集めめた。得られた細胞ペレットに、0.5% (v/v) トリトンX-100、0.25 M蔗糖、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5 mM CaCl₂を含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)100 mlに懸滴し、ワーリングブレンダーを用いて4°Cで5分間、5回ホモジナイズして細胞抽出物を得た。

得られた抽出物を35,000 g、10°Cで60分間遠心分離にかけて上澄液をを集めた。この上澄液から、

- 144 -

ンビンおよび5 nMの精製した本発明のペプチドを加えて37°Cで反応させた。反応物に300 $\mu g/ml$ のアンチトロンビンIII(米国シグマ社製)および5 mM EDTAを加えて反応を停止して、生成した活性型プロテインCの量を前述の合成基質を用いる方法で測定した。

結果を第20~24図に示すが、本発明のペプチドを無添加の場合(B)では活性型プロテインCの生成は認められなかった(点線)が、本発明のペプチドを添加した場合(A)には、反応時間と共に生成した活性型プロテインCの量が増加した(実線)。

実施例23

(抗血液凝固作用の確認)

本発明のペプチドがトロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの変換を阻害し、血液凝固を実質的に阻害することはハインリッヒ・アーレンゲン社(西独)製のコアギュロメーターKC-10を用いて血液凝固時間を測定することによって調べた。即ち、5 mM CaCl₂、0.1 M NaClを含む0.05 M

トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に3.0 μ gのフィブリノーゲン(米国シグマ社製、フラクション1)を加え、これに0-50 nMの精製した本発明のペプチドを加え、次いで、全量が0.4 mlになるように10 nMのトロンビンを加えて凝固時間を測定した。

結果を第25-29図に示す。トロンビンにくらべ、添加した精製ペプチドの量が多くなるにしたがって、血液凝固時間が延長されることが確認された。

実施例 2 4

(血小板凝集抑制作用の確認)

本発明のペプチドがトロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害することはSIENCO社(米国)製のプレートレットアグリゴーメーターを用いて評価した。即ち、30万cells/ μ lの血小板富液(Platelet Rich Plasma, P.R.P.)250 μ lに1単位のトロンビン(約0.4 μ g)を加えると血小板が凝集するが、トロンビンを加える前にその加えるトロンビンと等モル以上の精製した本発明のペプチドを加えておくと血小板の凝集が起きなかつた。

- 147 -

応用例 2

精製した本発明のペプチド	2.5 μ g
アルブミン	5 μ g
マンニトール	25 μ g
塩化ナトリウム	1.85 μ g
リン酸ナトリウム	3.85 μ g

上記成分にて、応用例1と実質的に同様の方法により注射用バイアルを製造した。

(発明の効果)

本発明のペプチドは、抗血液凝固作用、血小板凝集抑制作用、血栓溶解作用を併せ持ち副作用の少ない循環器系疾患や妊娠中毒症などの治療用薬として極めて有用な物質である。また、本発明のペプチドは、このような医薬用途以外に、たとえば、人工血管、人工臓器、カテーテルなどの医用人工材料に結合させて、血栓の形成を防止する薬剤として用いることができる。

(以下余白)

【適用例】

以下に本発明のペプチドの適用例を適用例をもって説明するが、本発明はそれら適用例により何ら限定されるものではない。

応用例 1

精製した本発明のペプチド	10 μ g
精製ゼラチン	20 μ g
マンニトール	100 μ g
塩化ナトリウム	7.8 μ g
リン酸ナトリウム	15.4 μ g

上記成分を注射用蒸留水2 mlに溶解し、無菌バイアルに入れ、-35°Cで2時間予備凍結し、-35°Cで真空度0.075 Torrで35時間一次乾燥し、次いで30°C、真空度0.03 Torrで5時間二次乾燥して、注射用バイアルを製造した。得られた組成物は、投与直前に生理食塩水もしくはブドウ糖注射液500 mlに溶解して点滴静注するのに用いられる。

(以下余白)

- 148 -

4. 図面の簡単な説明

第1図はヒト肺から精製して得られる、トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有するペプチドを参考例2において4回目のD1P-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した結果を示すグラフである。

第2(a)～(b)図は参考例3-(2)で得られるDNA断片TM13の塩基配列を示すものである。

第3(a)～(d)図は参考例3-(5)で得られるDNA断片TM137の塩基配列を示すものである。

第4(a)～(b)図は参考例3-(7)で得られるDNA断片TMP5の塩基配列を示すものである。

第5図は参考例3-(10)で得られるDNA断片TMP26の塩基配列を示すものである。

第6図は上記DNA断片TM13, TM13

7, TMP5およびTMP26と参考例3-

(13-1)及び3-(13-2)で得られるD

DNA断片TMJ1とTMJ2の制限酵素地図と、これらのDNA断片の有する塩基配列における対応関係を示すものであり、縦方向にみて各DNA断片の互いに重なる部分は共通の塩基配列を有することを示す。図中DNA断片TMJ2の制限酵素地図の斜線部分と斜交線部分とを含む部分は考えられるオープンリーディングフレームであり、斜交線部分に本発明のペプチドをコードする塩基配列が存在するものである。

第7図はTMJ1とそれに結合したTMP5を含有するプラスミドpUC18TMJ1の構造を示すフローチャートである。

第8図はTMJ1とそれに結合したTMP26を含有するプラスミドpUC18TMJ2の構造を示すフローチャートである。

第9図はTMJ2を動物細胞宿主用発現ベクターにTMJ2を挿入することによるプラスミドpSV2TMJ2の構造を示すフローチャートである。

第10図は実施例1-(2)-(a)で得られた

-151-

第13図は実施例1-(4)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13-TMD3にディリーターTMDが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第14図は実施例1-(4)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13-TMD3にディリーターTMDが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第15図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドpdBPVTMDS-1の構造を示すフローチャートである。

第16図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドpdBPVTMDS4-1の構造を示すフローチャートである。

-153-

た組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3にディリーターTMDが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第11図は実施例1-(2)-(b)で得られた組換え体プラスミドpSV2TMD1にディリーターTMDが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第12図は実施例1-(2)-(a)で得られた組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3にディリーターTMDが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

-152-

第17図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドpdBPVTMDS2-1の構造を示すフローチャートである。

第18図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドpdBPVTMDS1-1の構造を示すフローチャートである。

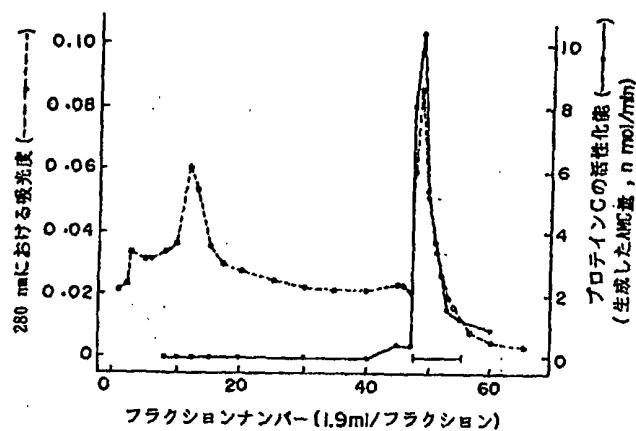
第19図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドpdBPVTMJ2-1の構造を示すフローチャートである。

第20~24図は精製した本発明のペプチドの存在下及び非存在下における、プロテインCとトロンビンとの反応によって生成した活性化プロテインCの量と反応時間との関係を示すグラフである。

第25~29図は精製した本発明のペプチドを添加した血液の凝固時間と精製した本発明のペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

特許出願人 旭化成工業株式会社

第 1 図



第 2 (a) 図

GAGTACCAAGT GCCAGCCCCCT GAACCAAAACT
AGCTACCTCT GCGTCTGC_G CGAGGGCTTC
 GCGCCCATTC CCCACGAGCC GCACAGGTGC
CAGATGTTTT GCAACCAGAC TGCCTGTCCA
 GCCGACTGCG ACCCCAACAC CCAGGGCTAGC
 TGTGAGTGCC CTGAAGGCTA CATCCTGGAC
 GACGGTTTCA TCTGCACGGG CATCGACGAG
 TGC_GAAAACG GCGGCTTCTG CTCCGGGTG
 TGCCACAAACC TCCCCGGTAC CTTCGAGTGC
 ATCTGC_{GGG}C CCGACTCGGC CCTTGTCGC
 CACATTGGCA CCGACTGTGA CTCCGGCAAG
 GTGGACGGTG GCGACAGCGG CTCTGGCGAG
 CCCCCGCCA GCGGACGCC CGGCTCCACC
 TTGACTCCTC CGGCCGTGGG GCTCGTGCAT
 TCGGGCTTGC TCATAGGCAT CTCCATCGCG
 AGCCTGTGCC TGGTGGTGGC GCTTTGGCG
 CTCCCTGTGCC ACCTGCGCAA GAAGCAGGGC
 CCGCCAGGG CCAA ATGGA GTACAAGTGC
 GCGGCCCTT CCAAGGGAGGT AGTGCTGCAG

第2(b) 図

CACGGTGGGA CCGAGGGAC GCGGAGAGA
 CCTCTGAGGG CCTCCGCTCCA GGAGCCCTGGC
 TCCGTCAGG AGCCTGTGCC TCCCTCACCC
 CAGCTTGCT ACCAAAGCAC CTTAGCTGGC
 ATTACAGCTG GAGAAAGCCC TCCCCGGCAC
 CCCCCAAGCTG TTTTGTCTA TTCCATGGCT
 AACTGGCGAG GGGGTGATTAA GAGGGAGGAG
 AATGAGCCTC GGCCCTTTCC GTGACGTCAC
 TGGACCACTG GGCAATGATG GCAATTGT
 AACGAAGACA CAGACTGCAG TTTGTCACAG
 GTCCCTCACTA CCGGGGGCAG GAGGGTGA
 GTTATGGTC GGCAAGCCTTC TGGGCAGACC
 TTGACCTCGT GGGCTAGGGAA TGAATAAAT
 ATTATTTT TTTAAGTATT TAGGTTTGT
 TTTGTTCTT CCTTAC CTTGATGTC
 CCAGTATCCA CTTTGACAG CTCCTCCGGTC
 TCTCTCTTC TACAAACTCC CACTTGTGAT
 GTGACAGGTA AACTATCTTG GTGAA

第3(a) 図

GGCTCCCTAC TCGTGCATGT GCGAGACCGG
 CTACCGGCTG GCGGCCGACC AACACCGGTG
 CGAGGACGTG GATGACTGCA TACTGGAGCC
 CAGTCCGGTGT CGGAGGGCT GTGTCAAACAC
 ACAGGGTGGC TTCCGAGTGGC ACTGCTACCC
 TAATACGAC CTGGTGGACG GCGAGTGTGT
 GGAGCCCCGTG GACCCCGTGT TCAGAGCCAA
 CTGGAGTAC CAGTGGCAGC CCCTGAACCA
 AACTAGCTAC CTCTGGCT GCGCCGAGGG
 CTTCGGCCCTT ATTCCCCAGG AGCCGCCAG
GGGCCAGATG TTTGTCAACC AGACTGGCTG
TCAGGCCAC TGGGAGCCCCA ACACCCAGGC
 TAGCTGTGAG TGCCCTGTGAG GCTACATCCT
 GGACGACGGT TTCATCTGCA CGGACATCGA
 CGAGTGGAA AACGGGGCT TCTGCTCCGG
 GGTTGTCAC AACCTCCCCG GTACCTTCGA
 GTGCATCTGC GGGCCGACT CGGCCCTTGT
 CGGCCACATT GGCAACGGACT GTGACTCCGG
 CAAGGTGGAC GTGGGGGACA GGGGCTCTGG
 CGAGCCCCCG CCCAGCCCCA CGCCGGCTC

第3 (b) 図

CACCTTGAAT CCTCCGGCG TGGGGCTCGT
 GCATTCGGGC TTGCTCATAG GCATCTCCAT
 CGCGAGCTG TGCTGGTGG TGGGGCTTT
 GGGGCTCCTC TGCCACCTGC GCAAGAAGCA
 GGGCGCCGGC AGGGCCAAGA TGGAGTACAA
 GTGCGGGGGC CCTTCCAAGG AGGTAGTGC
 GCAGCACGTC CGGACCGAGC GGACGCCGCA
 GAGACTCTGA GGGGCTCCG TCCAGGAGCC
 TGGCTCCGTC CAGGAGCTG TGCCTCCCTCA
 CCCCAAGCTT TGCTACAAA GCACCTTAGC
 TGGCATTACA GCTGGAGAAG ACCCTCCCCG
 CACCCCAA GCTGTTTCT TCTATTCAT
 GGCTAACTGG CGAGGGGGTG ATTAGAGGA
 GGAGAATGAG CCTCGGGCTC TTCCGTGACG
 TCACTGGACC ACTGGCAAT GATGGCAATT
 TTGTAACGAA GACACAGACT GCGATTGTC
 CCAGGGCTC ACTACGGGC GCAGGGGGT
 GAGCGTTATT GGTGGCAGC CTTCTGGGCA
 GACCTTGACC TCGTGGGCTA GGATGACTA

第3 (c) 図

AAATATTTAT TTTTTTTAAG TATTAGGT
 TTGTTTGTGTT TCCTTTGTC TTACCTGTAT
 GTCCTCCAGTA TCCACCTTGC ACAGCTCTCC
 GGTCTCTCTC TCTCTACAAA CTCCCACTTG
 TCAATGTGACA GGTAACATAT CTTGGTGAAT
 TTTTTTTCC TAGCCCTCTC ACATTATGA
 AGCAAGGGCC ACTTATTCCT CATTCTCCCT
 AGTTTTCTCC TCCCAGGAAC TGGGCCAACT
 CACCTGAGTC ACCCTACCTG TCCCTTGACCC
 TACTTCTTT GCTCTTAGCT GCTGCTCAG
 ACAGAACCCC TACATGAAC AGAAACAAA
 ACACCAAAAA TAAAAATGGC CATTGCTTT
 TTCACCAAGAT TTGCTAATT ATCCTGAAAT
 TTCAGATTCC CAGAGCAAA TAATTAA
 CAAAGGGTGA GATGTAAGAAT GATTAATT
 GATGTTGCTG GACTGTCATA GAAATTACAC
 CCAAGAGGT ATTTATCTT ACTTTAAAC
 AGTGAGCCTG AATTGGTTC GATGTTTGAT
 TTGTACTGAA AAATGGTAAT TGGTGTCAAT
 CTCTTATGC AATTTCCTT TTGTTTATTA

第3(d)図

TTACTTATT TTGACAGTGT TGAAATGTT
 CAGAAGGTTG CTCTAGATTG AGAGAAGAGA
 CAAACACCTC CCAGGAGACA GTTCAAGAAA
 GCTTCAAACT GCATGATTCA TGCCAAATTAG
 CAATTGACTG TCACTGTTCC TTGTCACTGG
 TAGACCAAA TAAACACACT TAACTGGTCT
 TGTGGATTG GGAGCTGGG ATGGATCCT
 GGAGGATGCC CAATTAGGGC CTAGGCTTAA
 TCAGGTCCCTC AGAGAATTTC TACCAATTCA
 GAGAGGCCCTT TTGGAAATGTC GCCCCTGAAAC
 AAGAATTGGA AGCTGCCCTG CCCATGGAG
 CTGGTTAGAA ATGCAAGAATC CTAGGCTCCA
 CCCCATCCAG TTCA TGAGAA TCTATATTTA
 ACAAGATCTG CAGGGGGT GTCTGCTCAG
 TAATTGAGG ACAACCATTC CAGACTGCTT
 CCAATTCTCT GGAAATACATG AAATATAGAT
 CAGTTATAAG TAGCAGGCCA AGTCAGGCC
 TTATTTCAA GAAACTGAGG AATTTTCTTT
 GTGTAGCTT GCTCTTGTG AGAAAAGGCT
 AGGTACACAG CTCTAGACAC TGCCACACAG
 GGTCTGCAAG GTCTTTGGTT CAGCTAAGCC
 GGAATTC

第4(a)図

CGGTGGCTGC CGATGTCATT TCCTTGCTAC
 TGAACGGGA CGGGGGGTT GGGCGCGGC
 GCTCTGGAT CGGCCCTGCA CTGCCACCG
 GCTGCGGGGA CCCCCAAGGCC CTCGGGCC
 TGGCGGGCTT CCAGTGGTT ACGGGAGACA
 ACAACACAG ^{HTTAA} CTATAGCAGG TGGGACGG
 TCGACCTCAA TGGGGCTCCC CTCTGGGCC
 CGTTGTCGGT ^{HTTAA} CGCTGTCCTCC GCTGCTGAGG
 CCACTGTGCC CAGCGAGCC ATCTGGAGG
 AGCAGCAGTG ^{HTTAA} CGAAGTGAAG GCGGATGGCT
 TCCCTTGCA GTTCACACTC CCAGCCACCT
 GCAAGGCCACT GGCTGGAG CCGGGGCC
 CGGCTGCCG CGTCCTGATC ACCTACGGCA
 CCCCGTTGC GGCCCGGGAA CGGGACTTCC
 AGGGCCTGC CGTGGCAGC TCCGGGCC
 TGGCTCCCCCT CGGCCCTACAG CTAATGTGCA
 CGGGCGGCC CGGAGGGTC CAGGGCACT
 GGGCCAGGGAA GGGGCCGGGC GCTTGGGACT
 GCAGGGTGGAA GAACGGGGC TGGGAGCACG

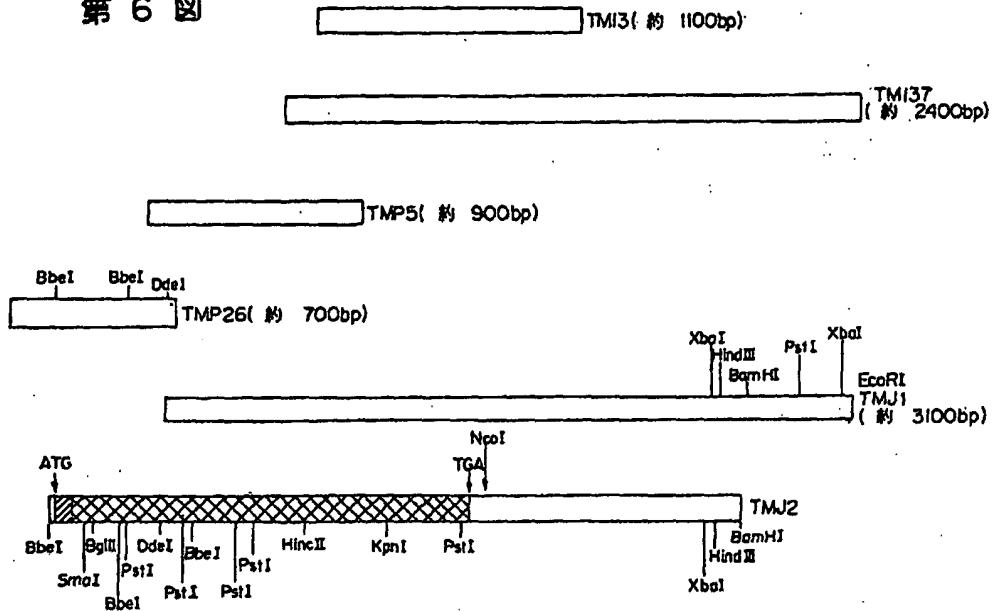
第4(b) 図

CGTGCATGC GATCCCTGGG GCTCCCCGCT
GCCAGTGCC AGCCGGCC GCCCCTGCAGG
CAGACGGCC CTCCTGCACC GCATCCCGGA
CGCAGTCCTG CAACGACCTC TGCAGAGCACT
TCTGCCTTC CAACCCGAC CAGCCGGGCT
CCTACTCGTG CATGTCGAG ACCGGCTACC
GGCTGGGGC CGACCAACAC CGGTGCGAGG
ACGTTGGATGA CTGCATACTG GAGCCCCAGTC
CGTGTCCGCA GCGCTGTGTC AACACACAGG
GTGGCTTCGA GTGCCACTGCT TACCCCTAATC
ACGACCTGGT GGACGGGGAG TGTGTGGAGC
CCGGGGACCC GTGCTTCAGA GCCAACTGGG
AGTACCCAGTG CCAGCCCTG AACCAAACATA
GCTACCTCTG CGTCTGGCC GAGGGCTTCG
CGCCCATTCG CCACGAGCCG CACAGGTGCC
AGATGTTTG CAACCAAGACT GCCTGTC

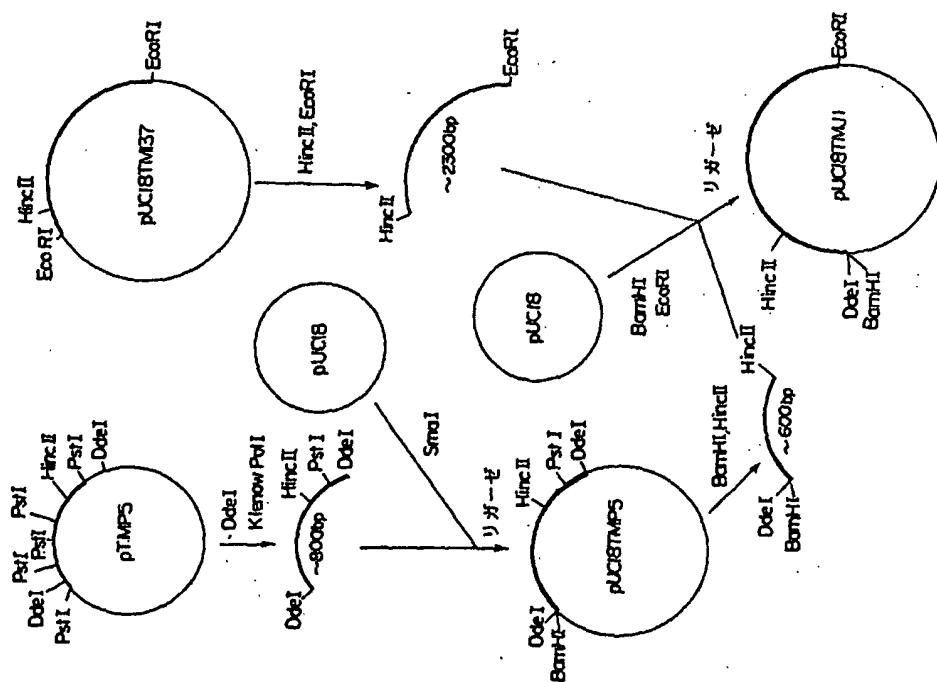
第5図

GGCCCTGTCG CAGTCCCCG GCTTTCCCCG
GGCCCTGTCAC GCGCCGGCC TGGGTAACAT
GCTTGGGGTC CTGGTCCCTG GCGCGCTGGC
CCTGGCCGGC CTGGGGTTC CCGCACCCGC
AGAGCCGAG CGGGGGGCA GCCAGTGCCT
CGAGCACGAC TGCTTCGGC TCTACCCGGG
CCCCGGACCC TTCCCTCAATG CCAGTCAGAT
CTGGGACGGA CTGGGGGGC ACCTAATGAC
AGTGGCCTCC TCGGTGGCTG CGGATGTCACT
TTCCTTGCTA CTGAACGGG ACGGGGGGT
TGGCCGGGG CGCCCTCTGGA TCGGGCTGCA
GCTGCCACCC GGCTGGGG ACCCCAAAGCG
CCCTCGGGCCC CTGGGGGCT TCCAGTGGGT
TACGGGAGAC AACAAACACCA GCTATAAGCAG
GTGGGAGGG CTGACCTCA ATGGGGCTCC
CCCTCTGGC CGGTTGTGG TCGCTGTCTC
CGCTGCTGAG GCCACTGTGC .CCAGCGAGCC
GATCTGGAG GAGCAGCACT GCGAAGTGAA

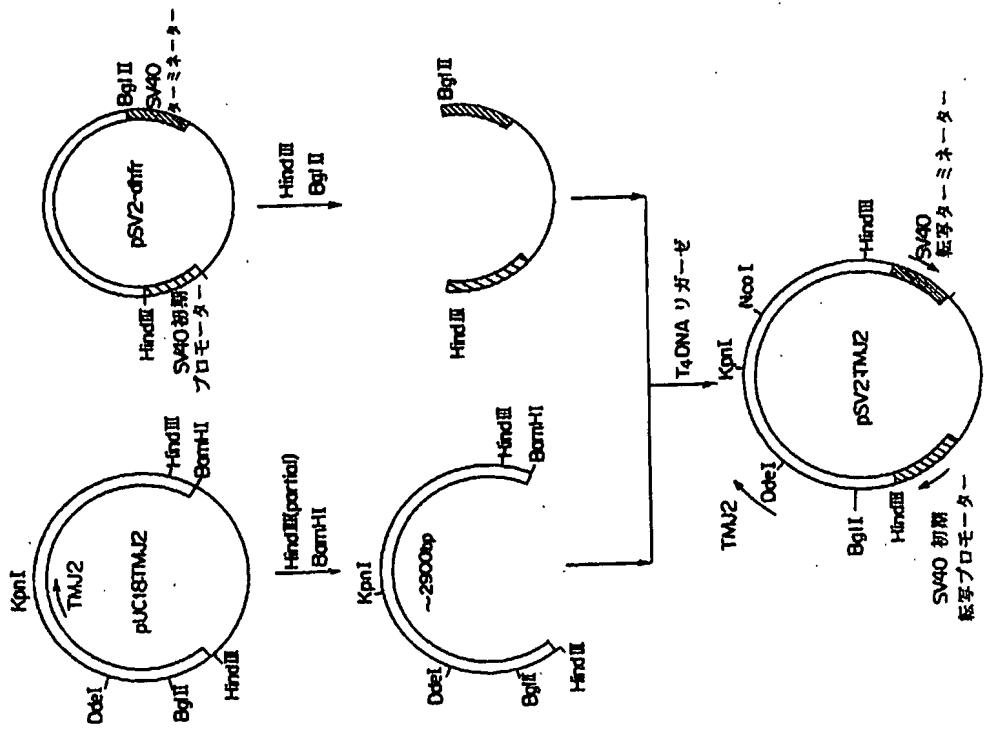
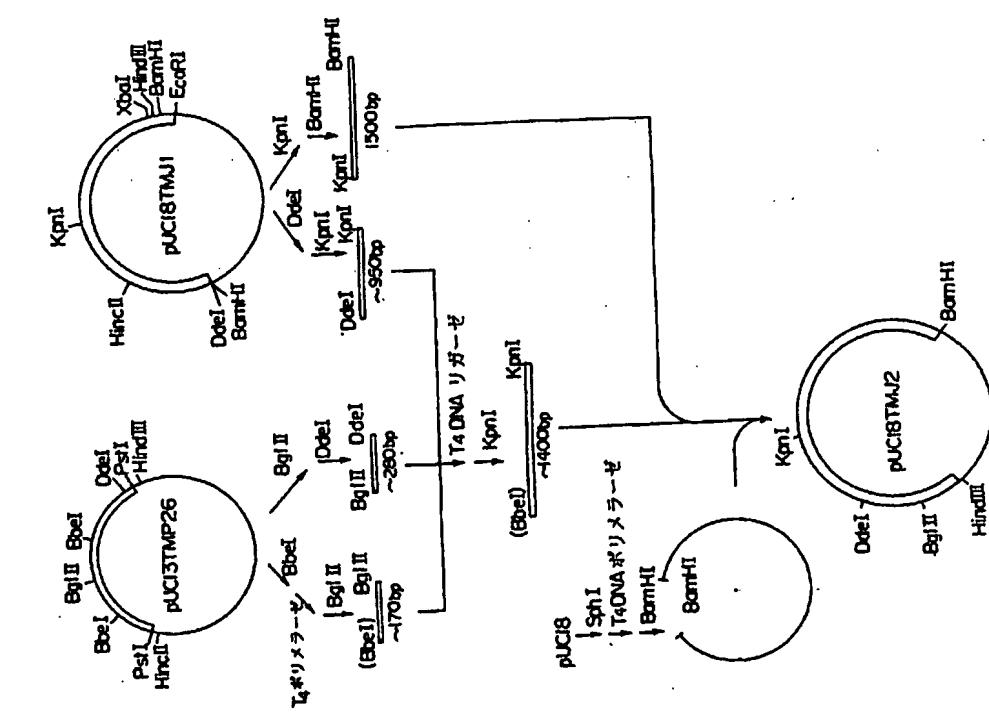
第 6 図



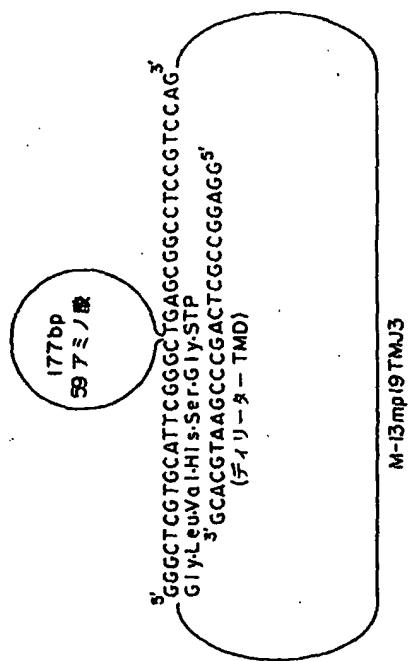
• 7



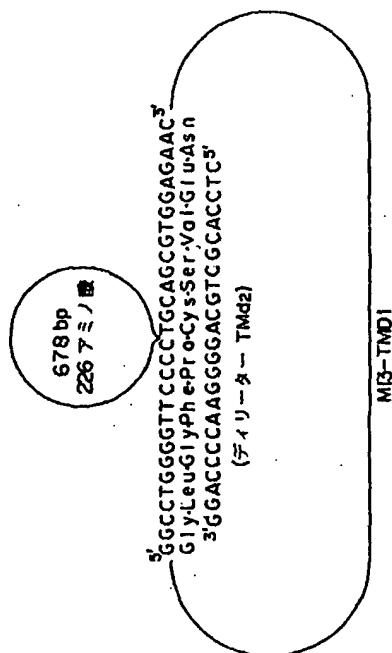
第 8 図 第 9 図



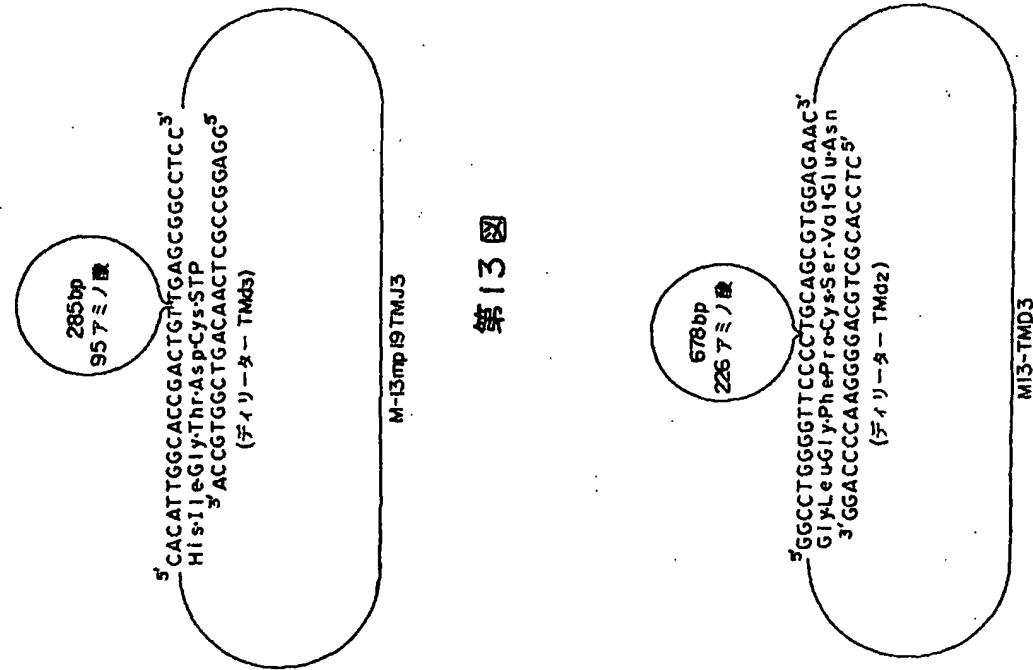
第10図



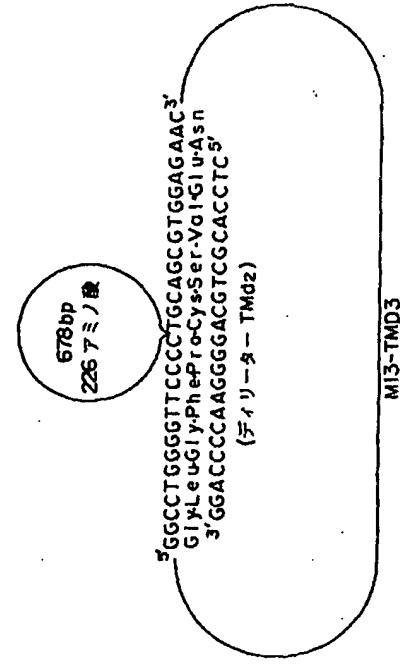
第11図



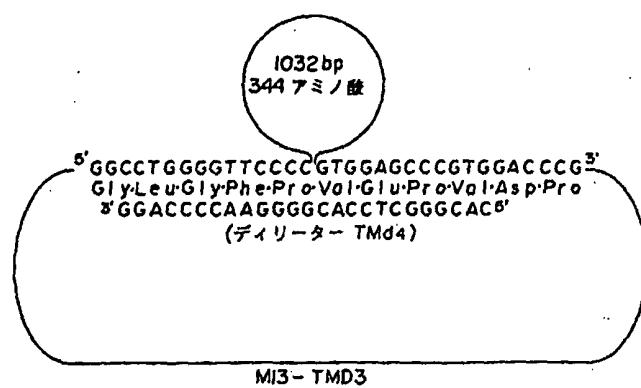
第12図



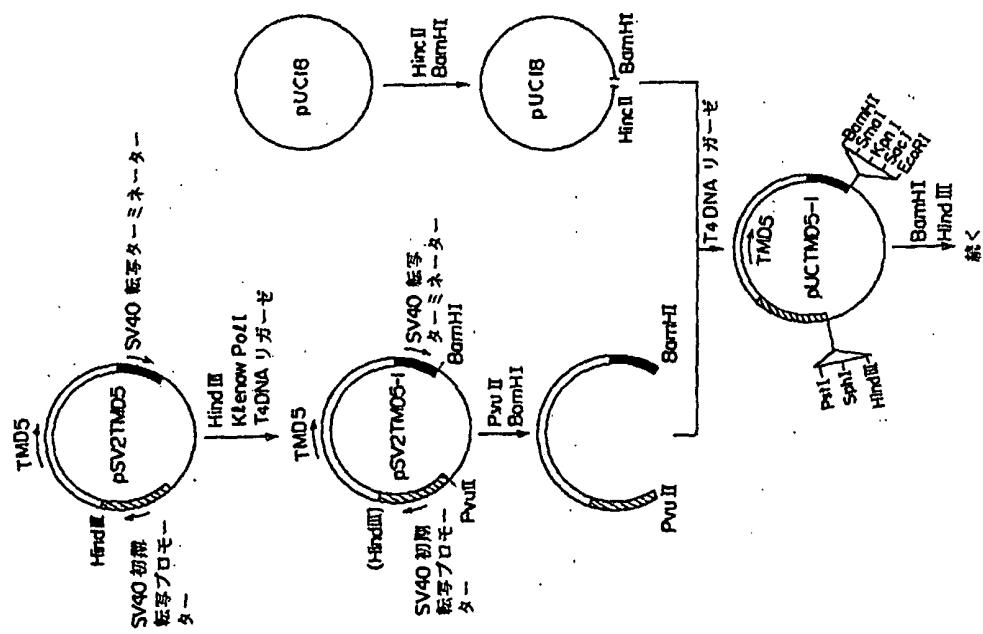
第13図



第14図



第15(a)図



第6章

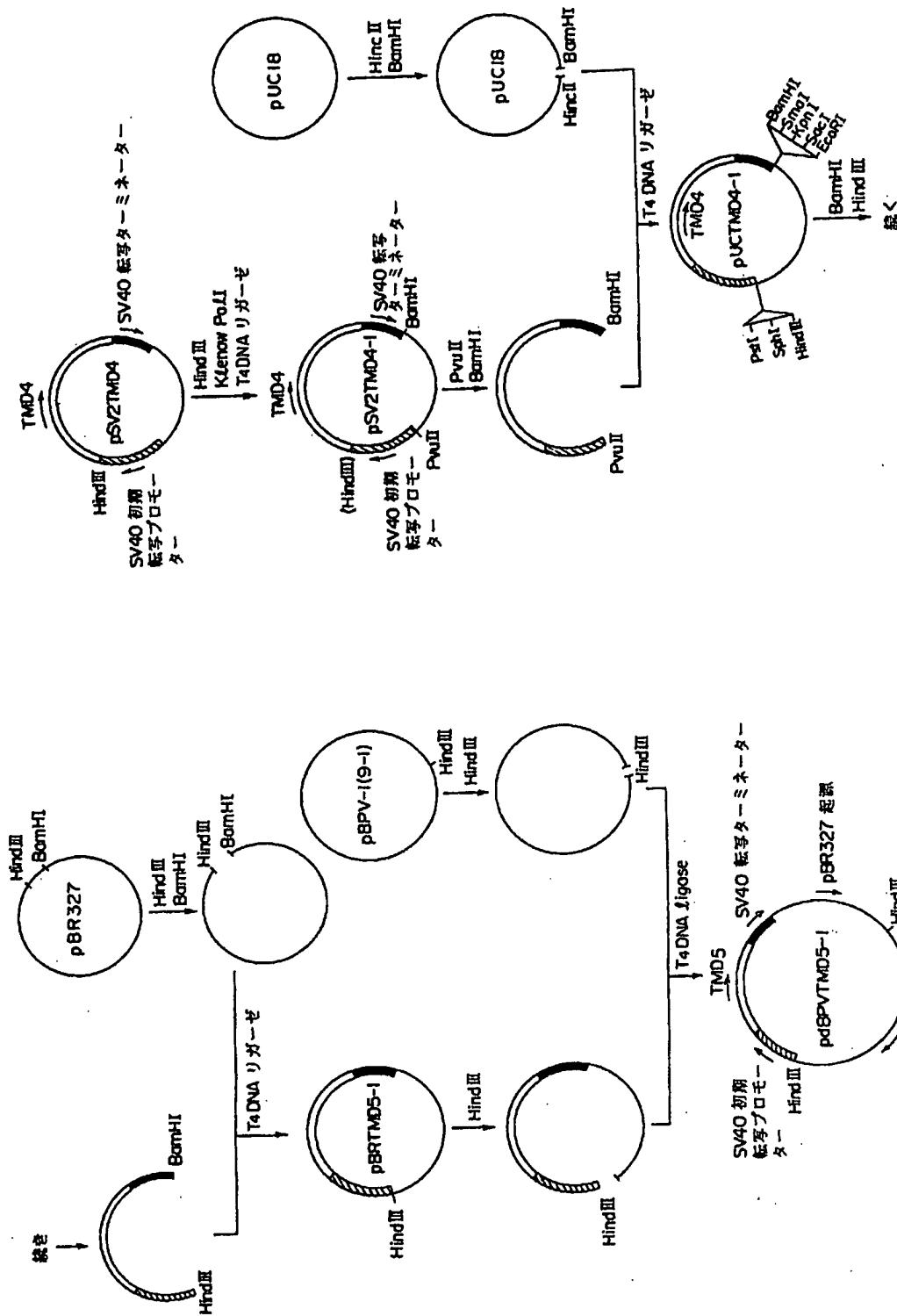
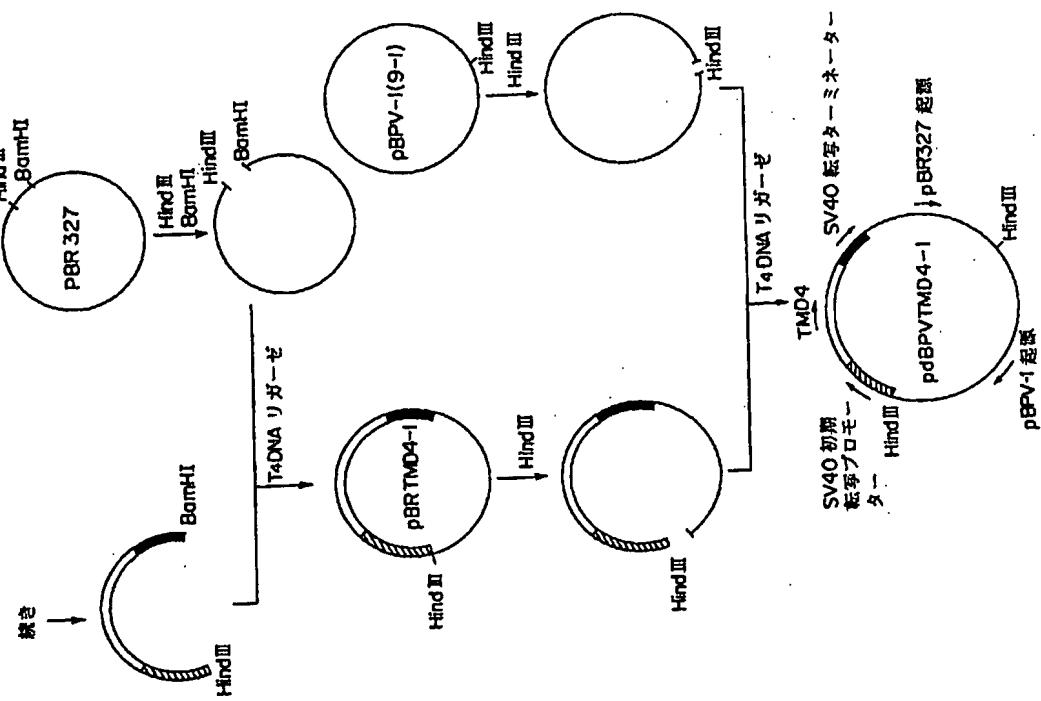


圖 1-5 (b)

第16 (b) 圖



第17(a)圖

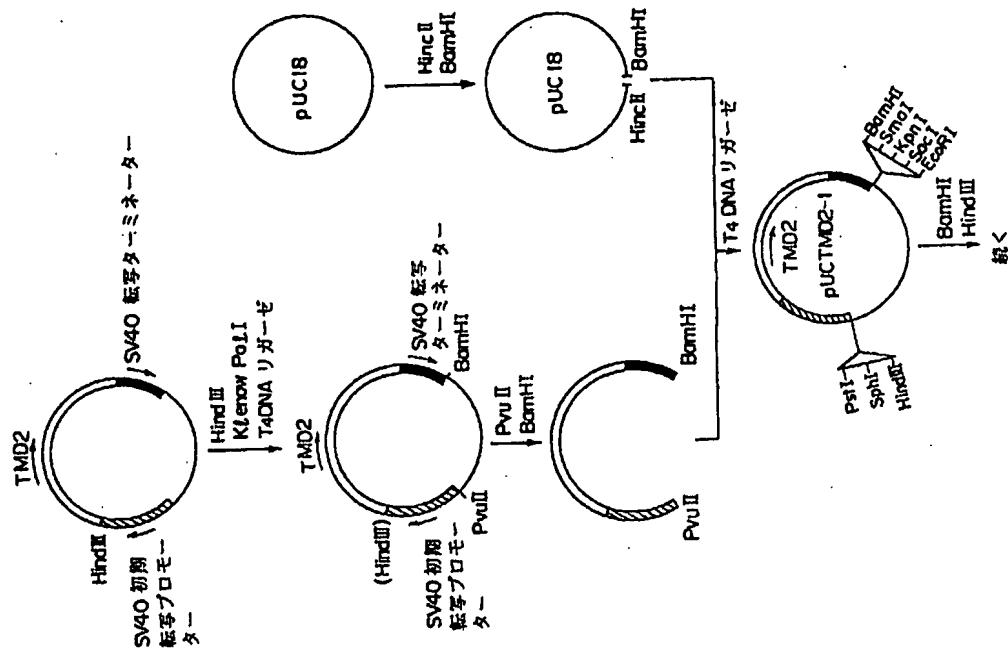
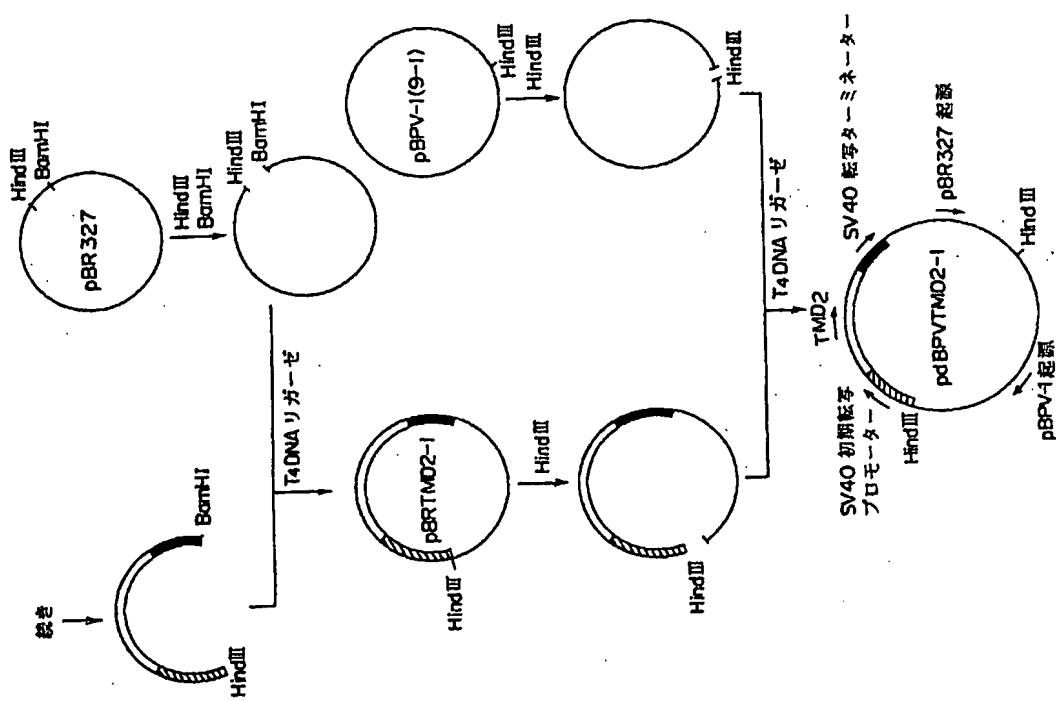


图 17(b)



第18(a)圖

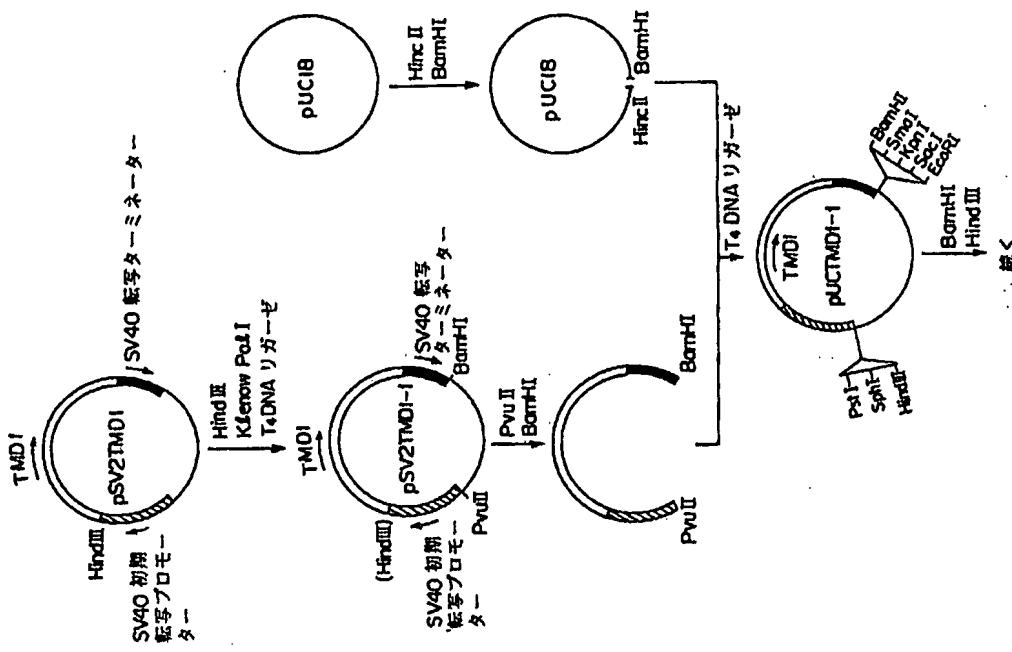
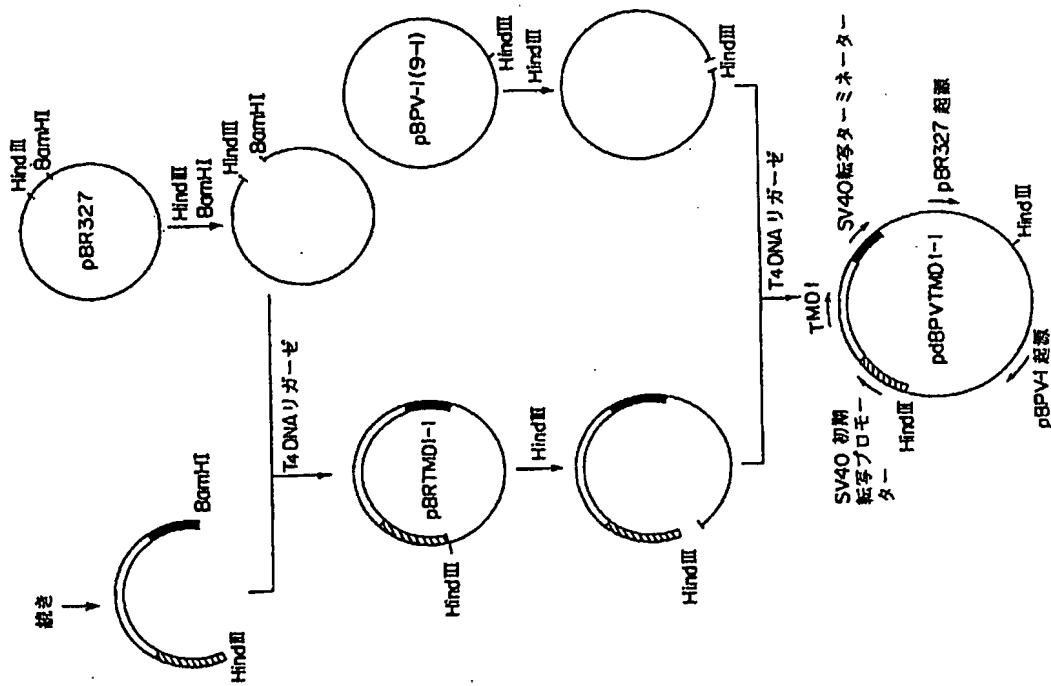
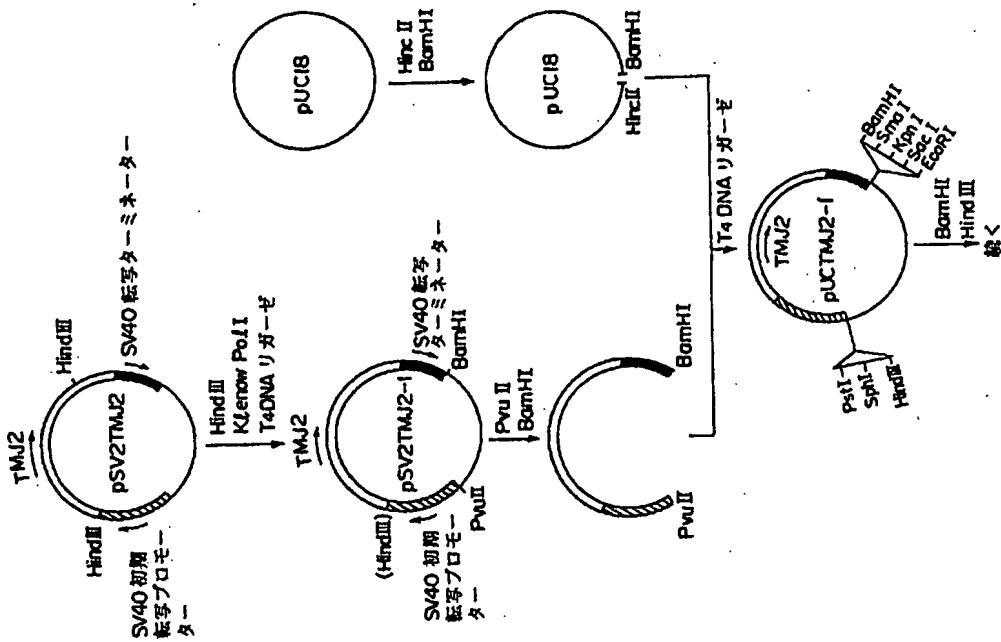


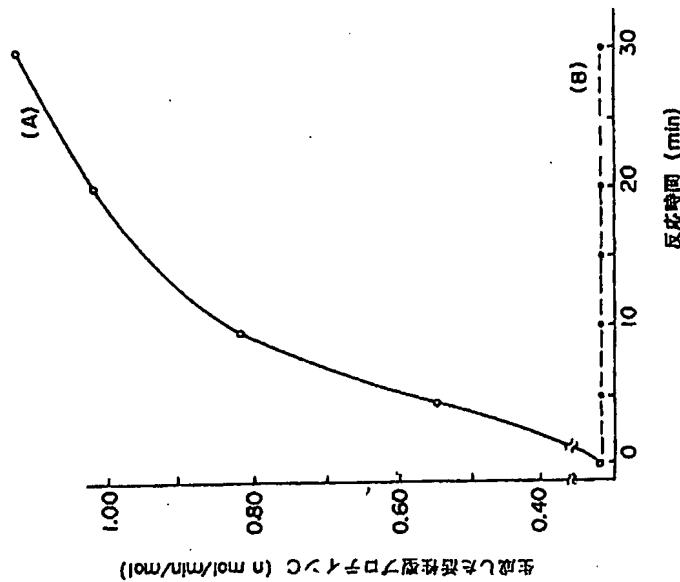
圖 18 (b)



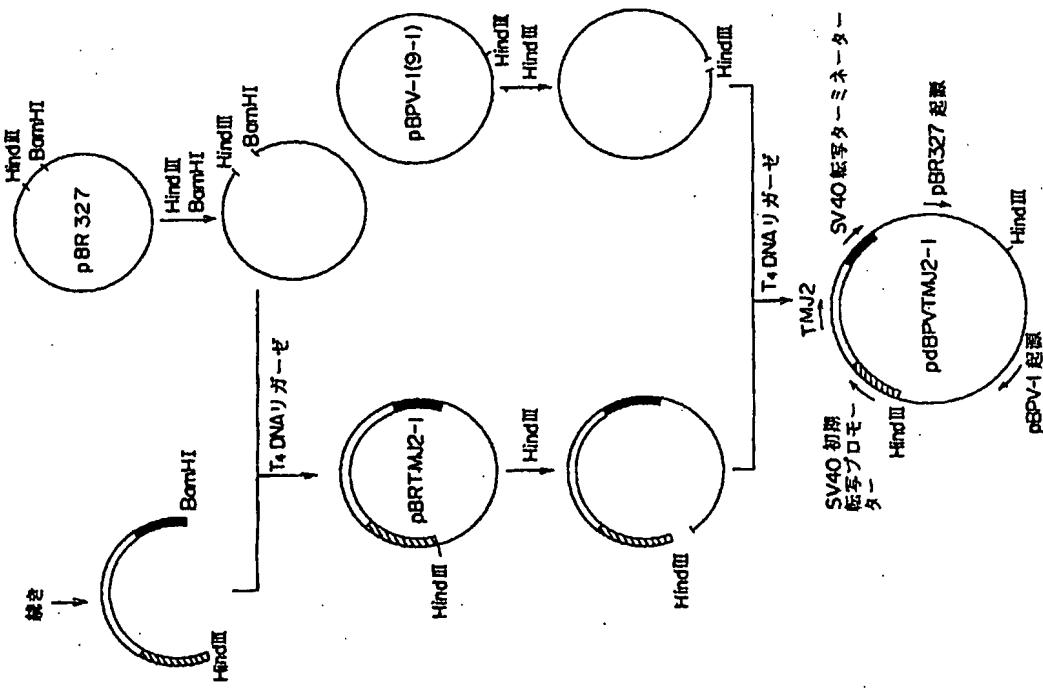
第19(口)図



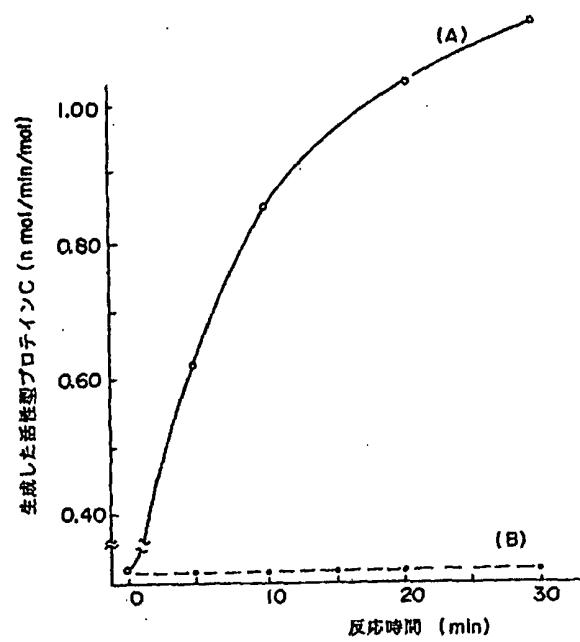
第20図



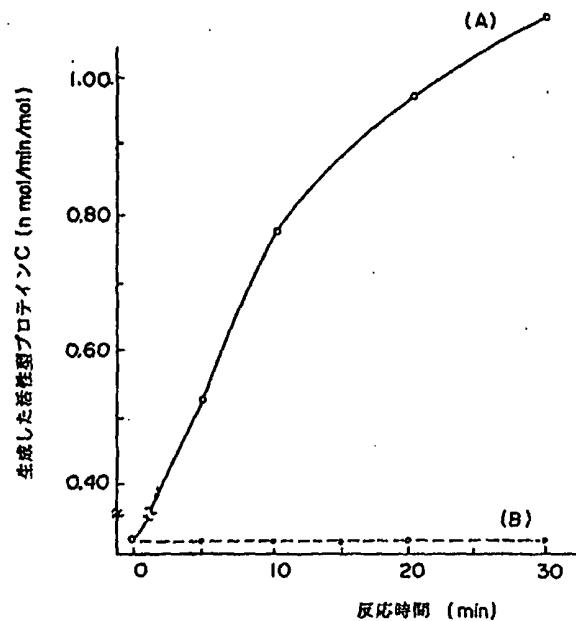
第19(b)図



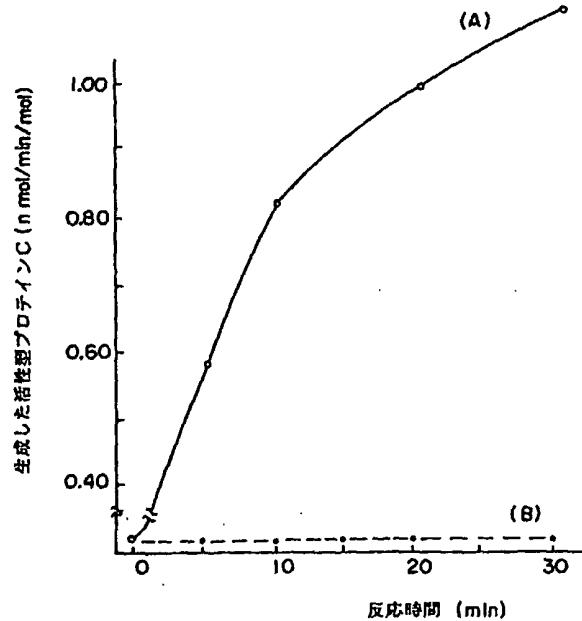
第21図



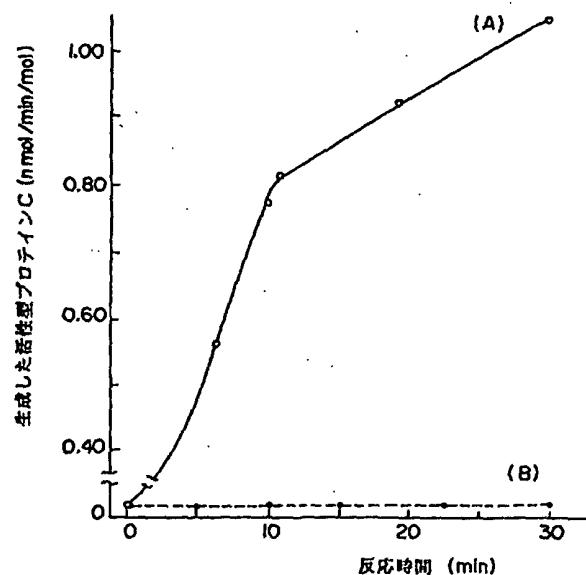
第22図



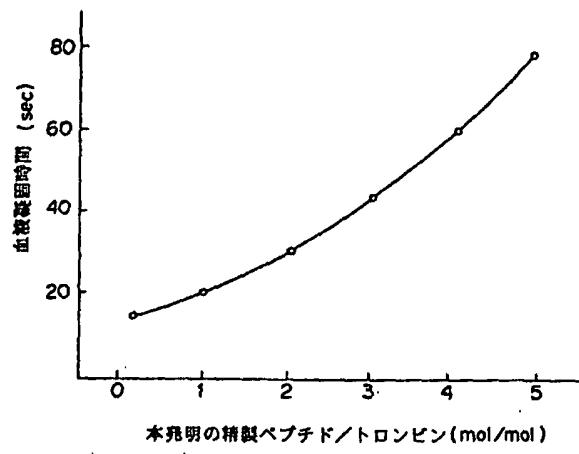
第23図



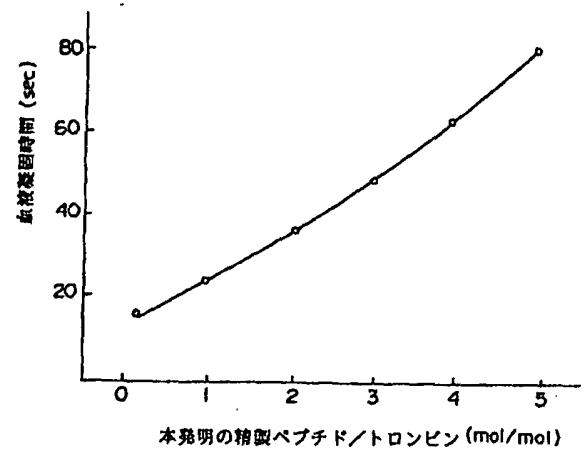
第24図



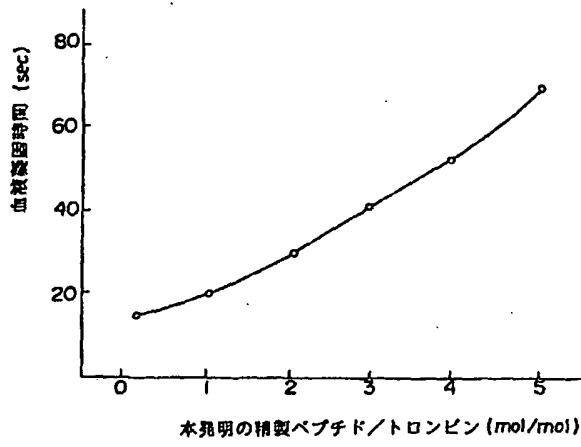
第25図



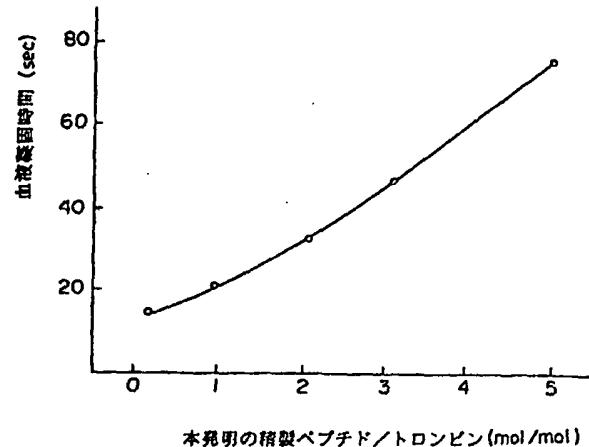
第26図



第27図



第28図



第29図

